

## NEUTRALIZATION OF FOOD ALLERGENS BY THIOREDOXIN

特許公報番号 JP10510244T

公報発行日 1998-10-06

発明者:

出願人

分類:

一国際:

A23K1/18; A21D2/26; A21D2/36; A21D13/06; A23C9/00;  
A23C9/12; A23K1/16; A23L1/015; A23L1/10; A23L1/20;  
A23L1/211; A23L1/31; A23L1/314; A61K35/20;  
A61K35/34; A61K35/54; A61K36/899; A61K38/44;  
A61K38/46; A61K39/35; A61P37/08; C07K1/00;  
C07K14/415; C07K14/435; C12N9/02; C12Q1/26;  
C12Q1/34; A23K1/18; A21D2/00; A21D13/00; A23C9/00;  
A23C9/12; A23K1/16; A23L1/015; A23L1/10; A23L1/20;  
A23L1/211; A23L1/31; A23L1/314; A61K35/20;  
A61K35/34; A61K35/48; A61K36/88; A61K38/43;  
A61K39/35; A61P37/00; C07K1/00; C07K14/415;  
C07K14/435; C12N9/02; C12Q1/26; C12Q1/34; (IPC1-7):  
A23K1/16; A23K1/18; A61K35/20; A61K35/34; A61K35/54;  
A61K35/78; A61K38/46; C07K1/00; A23C9/00; A23L1/10;  
A23L1/20; A23L1/31

一欧州:

A21D13/06D; A21D2/26D; A21D2/26D2; A21D2/36;  
A23C9/12B4; A23L1/015E; A23L1/211E; A23L1/314E;  
A61K38/44; A61K39/35; C07K14/415; C07K14/435A;  
C12N9/02D; C12Q1/26; C12Q1/34

出願番号 JP19950514000T 19951018

優先権主張番号: WO1995US13206 19951018; US19940326976 19941021

他の公開



WO9612799 (A1)

EP0784676 (A1)

EP0784676 (A0)

ここにデータエラーを報告してください

下記の要約はありません JP10510244T

対応特許の要約 **WO9612799**

Thioredoxin, a small dithiol protein, is a specific reductant for major allergenic proteins present in widely used foods from animal and plant sources. All targeted allergenic proteins contain disulfide (S-S) bonds that are reduced to the sulfhydryl (SH) level by thioredoxin. The proteins are allergenically active in the oxidized (S-S) state. When reduced (SH state), they lose their allergenicity. Thioredoxin achieved this reduction when activated (reduced) either by NADPH via NADP-thioredoxin reductase (physiological conditions) or by dithiothreitol, a chemical reductant. Skin tests and feeding experiments carried out with sensitized dogs showed that treatment of the food with reduced thioredoxin prior to ingestion eliminated or decreased the allergenicity of the food.

esp@cenet データベースから供給されたデータ - Worldwide

**NEUTRALIZATION OF FOOF ALLERGENS BY THIOREDOXIN****Publication number:** WO9612799**Publication date:** 1996-05-02**Inventor:** BUCHANAN BOB B; KOBREHEL KAROLY; YEE BOIHON C; LOZANO ROSA; FRICK OSCAR L; ERMEL RICHARD W**Applicant:** UNIV CALIFORNIA (US)**Classification:**

**- international:** A23K1/18; A21D2/26; A21D2/36; A21D13/06; A23C9/00; A23C9/12; A23K1/16; A23L1/015; A23L1/10; A23L1/20; A23L1/211; A23L1/31; A23L1/314; A61K35/20; A61K35/34; A61K35/54; A61K36/899; A61K38/44; A61K38/46; A61K39/35; A61P37/08; C07K1/00; C07K14/415; C07K14/435; C12N9/02; C12Q1/26; C12Q1/34; A23K1/18; A21D2/00; A21D13/00; A23C9/00; A23C9/12; A23K1/16; A23L1/015; A23L1/10; A23L1/20; A23L1/211; A23L1/31; A23L1/314; A61K35/20; A61K35/34; A61K35/48; A61K36/88; A61K38/43; A61K39/35; A61P37/00; C07K1/00; C07K14/415; C07K14/435; C12N9/02; C12Q1/26; C12Q1/34; (IPC1-7): C12N9/28; A21D13/00; A23L1/168; A23L1/172; A23L1/18; A61K35/14; A61K35/70; A61K35/80; C07K1/00; C07K2/00; C07K4/00; C07K14/00; C07K16/00; C12N9/96; C12N11/02; C12Q1/34

**- European:** A21D13/06D; A21D2/26D; A21D2/26D2; A21D2/36; A23C9/12B4; A23L1/015E; A23L1/211E; A23L1/314E; A61K38/44; A61K39/35; C07K14/415; C07K14/435A; C12N9/02D; C12Q1/26; C12Q1/34

**Application number:** WO1995US13206 19951018**Priority number(s):** US19940326976 19941021**Also published as:**

EP0784676 (A1)

EP0784676 (A0)

**Cited documents:**

US5028419

XP001062292

XP000984131

XP001062277

XP001062263

more &gt;&gt;

[Report a data error here](#)**Abstract of WO9612799**

Thioredoxin, a small dithiol protein, is a specific reductant for major allergenic proteins present in widely used foods from animal and plant sources. All targeted allergenic proteins contain disulfide (S-S) bonds that are reduced to the sulfhydryl (SH) level by thioredoxin. The proteins are allergenically active in the oxidized (S-S) state. When reduced (SH state), they lose their allergenicity. Thioredoxin achieved this reduction when activated (reduced) either by NADPH via NADP-thioredoxin reductase (physiological conditions) or by dithiothreitol, a chemical reductant. Skin tests and feeding experiments carried out with sensitized dogs showed that treatment of the food with reduced thioredoxin prior to ingestion eliminated or decreased the allergenicity of the food.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平10-510244

(43) 公表日 平成10年(1998)10月6日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	F I	
C 0 7 K	1/00	C 0 7 K	1/00
A 2 3 C	9/00	A 2 3 C	9/00
A 2 3 L	1/10	A 2 3 L	1/10
	1/20		1/20
	1/31		1/31
			Z
			E
			Z

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全117頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平8-514000	(71) 出願人	ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ ティ オブ カリフォルニア アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94612-3550 オークランド レイクサイ ド ドライブ 300 トウエンティセカン ド フロアー
(86) (22) 出願日	平成7年(1995)10月18日	(72) 発明者	ブキャナン ボブ ビー アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94708 パークレイ タマルピアス ロー ド 19
(85) 翻訳文提出日	平成9年(1997)4月21日	(74) 代理人	弁理士 中村 稔 (外6名)
(86) 国際出願番号	PCT/US 95/13206		
(87) 国際公開番号	WO 96/12799		
(87) 国際公開日	平成8年(1996)5月2日		
(31) 優先権主張番号	08/326,976		
(32) 優先日	1994年10月21日		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 チオレドキシニンによる食品アレルギーの中和

## (57) 【要約】

チオレドキシニン、低分子ジチオールタンパク質は、動物及び植物源から広く用いられる食物中に存在する主要なアレルギータンパク質に特異的な還元剤である。全ての標的アレルギータンパク質は、チオレドキシニンによってスルフヒドリル (SH) レベルに還元されるジスルフィド (S-S) 結合を有する。それらのタンパク質は、酸化 (S-S) 状態でアレルギー発現に活性である。還元される (SH状態) とそれらのアレルギー発現性を喪失する。チオレドキシニンは、NADP-チオレドキシニンレダクターゼ (生理的状态) を経るNADPH或いはジチオトレイトール、化学還元剤によって活性化 (還元) された場合にその還元を達成した。感作したイヌを用いて行われた皮膚テスト及び摂食実験から、該食物を摂取前に還元チオレドキシニンで処理すると該食物のアレルギー発現性を消滅又は低下させることがわかった。

## 【特許請求の範囲】

1. 1個以上のジスルフィド結合を有するアレルギータンパク質を還元する方法であって、

(a) 前記タンパク質と、特定量の還元チオレドキシン又はチオレドキシン存在下のD T Tとを接触させる工程であって、該チオレドキシン又はD T T及びチオレドキシンの量が前記タンパク質中の1個以上のジスルフィド結合を還元するのに有効な量である、前記工程、及び

(b) 前記接触を、前記タンパク質中の1個以上のジスルフィド結合を還元するのに十分な時間維持して、前記アレルギータンパク質を還元する工程を含む方法。

2. 該アレルギータンパク質が、牛肉、牛乳、ダイズ、卵、米及び小麦のアレルギータンパク質からなる群より選ばれる請求項1記載の方法。

3. 該ジスルフィド結合が鎖内ジスルフィド結合である請求項1記載の方法。

4. 該チオレドキシンがN T R及びN A D P Hで還元される請求項1記載の方法。

5. 食物アレルギータンパク質のアレルギー発現性を低下させる方法であって、

(a) 該タンパク質と、該タンパク質のアレルギー発現性を低下させるのに有効な量のチオレドキシン、N T R及びN A D P H又は該量のチオレドキシン存在下のD T Tとを接触させる工程、及び

(b) 工程(a)で接触させたタンパク質を動物に投与する工程であって、前記動物によって示される前記アレルギー症状が対照と比べて軽減される、前記工程

を含む方法。

6. 該食物アレルギータンパク質が、牛肉、牛乳、卵、ダイズ、米及び小麦のタンパク質からなる群より選ばれる請求項5記載の方法。

7. アレルギー食物のアレルギー発現性を低下させる方法であって、

(a) アレルギー食物を、該食物のアレルギー発現性を低下させるのに有効な量のチオレドキシン、N T R及びN A D P Hで処理する工程、

(b) 工程(a)で処理された食物を前記食物アレルギーの動物に投与して

前記動物によって示されるアレルギー症状を対照に比べて軽減する工程

を含む方法。

8. 前記食物中のタンパク質25gに対して、チオレドキシンの量が約12.5~750 $\mu$ gであり、NTRの量が約12.5~37.5 $\mu$ gであり、NADPHの量が約1.5~30 $\mu$ Mである請求項7記載の方法。

9. 前記食物がダイズ又は小麦を含む請求項7記載の方法。

10. 添加チオレドキシンとNTRを含有し、更に添加NADPHから生じたNADPを含有する摂取可能な食品。

11. 前記食品中のタンパク質25gに対して、該添加チオレドキシンが少なくとも200 $\mu$ gであり、該NTRが少なくとも100 $\mu$ gであり、該添加NADPHが少なくとも5 $\mu$ Mである請求項10記載の食品。

12. チオレドキシン、NTR及びNADPHで処理された摂取可能な低アレルギー食品。

13. 該食品がペットフードである請求項12記載の食品。

14. 前記食品中のタンパク質25gに対して、チオレドキシンの量が約200~400 $\mu$ g、NTRの量が約100~200 $\mu$ gであり、NADPHの量が約5~20 $\mu$ Mである請求項12記載の食品。

15. 該食品が牛肉、卵、ダイズ、小麦又は牛乳のタンパク質を含有する請求項12記載の食品。

16. 1個以上のジスルフィド結合を有するタンパク質のタンパク質分解を増進させる方法であって、

(a) 前記タンパク質と、有効量の還元チオレドキシン又はチオレドキシン存在下のDTTとを接触させる工程、

(b) 前記接触を、前記タンパク質中の1個以上のジスルフィド結合を還元するのに十分な時間維持して、前記アレルギータンパク質を還元する工程、及び

(c) 工程(b)で得られた前記タンパク質とタンパク質分解酵素とを接触させて、チオレドキシン処理タンパク質のタンパク質分解を対照に比べて増進させる工程

(4)

特表平10-510244

を含む方法。

## 【発明の詳細な説明】

### チオレドキシンによる食品アレルギーの中和

#### 相互引照

本特許出願は、1994年4月12日付けの特許出願第08/211,673号の一部継続出願であり、また特許出願第08/211,673号は、1992年8月25日付けの特許出願第07/935,002号の一部継続出願であり、更に特許出願第07/935,002号は、1991年10月12日付けの特許出願第07/776,109号の一部継続出願である。

#### 発明の分野

本発明は、チオールレドックスタンパクを使用して、種子タンパク、例えば穀類タンパク、酵素阻害タンパク、毒液毒素タンパクおよび幾つかの他のタンパクの分子内ジスルフィド結合を還元することに関する。より詳しく言えば、本発明は、チオレドキシンおよびグルタレドキシンを使用して、グリアジン、グルテニン、アルブミンおよびグロブリンを還元し、ドウおよび焼き製品の諸特性を改善し、かつ新規なドウを生成し、シスチン含有タンパク、例えばアミラーゼおよびトリプシン阻害剤等を還元して、飼料および穀物製品の性能を改善することに関連する。更に、本発明はプルラナーゼを阻害する新規なタンパクの単離およびこの新規なタンパクのチオールレドックスタンパクによる還元をも包含する。本発明は、更に油一貯蔵型種子に特徴的な2Sアルブミンタンパクのチオレドキシンによる還元をも包含する。また、本発明は、ヘビの神経毒素および幾つかの昆虫およびサソリ毒液毒素をインビトロで不活性化し、個体中の対応する毒力に対処することをも包含する。本発明は、更にチオレドキシンを使用して、食品アレルギーのアレルギー誘発性を減じることをも包含する。

本発明は、ナショナルサイエンスファウンデーション(National Science Foundation)により承認された、許可契約番号DCB 8825980号およびDMB 88-15980号の下で、行政府の支援によりなされた。従って、米国行政府は本発明における権利の幾分かをもつ。

#### 発明の背景

葉緑体は、フェレドキシン、フェレドキシナーチオレドキシンリダクターゼお

よびチオレドキシン f および m により構成され、光合成用酵素の調節と光とを結び付ける、フェレドキシン/チオレドキシン系を含む (ブキャナン (Buchanan), B.B. (1991), 「酸素関連光合成における  $\text{CO}_2$  同化の調節: フェレドキシン/チオレドキシン系。その発見、現状および将来的発展の展望 (Regulation of  $\text{CO}_2$  assimilation in oxygenic photosynthesis: The ferredoxin/thioredoxin system. Perspective on its discovery, present status and future development)」, Arch. Biochem. Biophys., 288:1-9; シーブ (Scheibe), R. (1991), 「葉緑体酵素のレドックス-調節。個々の調節に関する一般的原理 (Redox-modulation of chloroplast enzymes. A common principle for individual control)」, Plant Physiology, 96:1-3)。幾つかの研究は、動物および殆どの微生物に対して確立されたものと類似する系を、植物も含むことを示した。該系において、チオレドキシン (h-型) は NADPH およびその酵素 NADP-チオレドキシンリダクターゼ (NTR) によって、以下のように還元される:

#### NTR



(フロレンチオ (Florencio) F.J. 等 (1988), Arch. Biochem. Biophys., 266: 496-507; ジョンソン (Johnson), T.C. 等, (1987), Plant Physiology, 85:446-451; ザスク (Suske), G. 等, (1979), Z. Naturforsch. C., 34:214-221)。一般的な証拠は、該 NADP/チオレドキシン系が植物組織内に広範囲に分布しており、かつミトコンドリア、小胞体およびサイトゾル中に収容されていることを示唆している (ボーデンシュタイン-ラング (Bodenstein-Lang), J. 等, (1989), FEBS Lett., 258:22-26; マーカス (Marcus), F. 等, (1991), Arch. Biochem. Biophys., 287:195-198)。

チオレドキシン h も、炭水化物の代謝、ピロリン酸塩フルクトース-6-P、1-ホスホトランスフェラーゼまたは PFP のサイトゾル酵素を還元により活性化すること

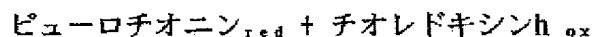
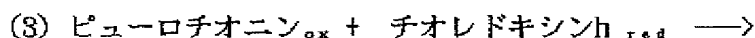
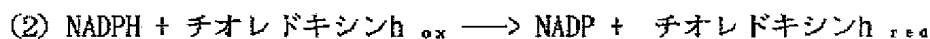
が知られている (キス (Kiss), F. 等, (1991), Arch. Biochem. Biophys., 287: 337-340)。

種子は、該 NADP/チオレドキシン系が、植物中の生理的活性の拠り所となって



いる唯一の組織である。また、チオレドキシンhは、研究室においてチオニンを還元することが示されている（ジョンソン(Johnson), T.C.等, (1987), Plant Physiol., 85:446-451)。チオニンはシスチンに富む可溶性の穀類種子タンパクである。該ジョンソン等の研究においては、小麦ピュロチオニンが、以下の式2および3に従って、NADP-チオレドキシンリダクターゼ(NTR)およびチオレドキシンhを介して、NADPHによって、実験的に還元された：

## NTR



穀類種子、例えば小麦、ライ麦、大麦、コーン、キビ、モロコシおよび稲の種子は、4つの主な種子タンパク群を含む。これら4種の群はアルブミン、グロブリン、グリアジンおよびグルテニンまたは対応するタンパク質である。チオニンはアルブミン群または類に属する。現時点において、小麦およびライ麦のみが、グルテンまたはドウを作成するのに使用されている穀類である。グルテンは粘着性、弾性かつゴム状のタンパク複合体であり、これはドウに対して凝集性を与える。グルテンは、その殆どがグリアジンおよびグルテニンタンパクから構成されている。これは、ライ麦および小麦ドウを水洗した場合に形成される。パンのドウに弾性型の特性を与えるのはこのグルテンである。他の主要な栽培穀類大麦、コーン、モロコシ、燕麦、キビおよび米由来の粉、並びに植物、大豆等由来の粉は、小麦およびライ麦に対して利用されている条件下では、グルテン様の網状組織を形成しない。

グルテニンおよびグリアジンは、シスチン含有種子貯蔵タンパクであり、かつ不溶性である。貯蔵タンパクは、発芽の際に分解され、発芽中の苗の成長並びに発育のために利用される、種子中のタンパクである。プロラミン類は小麦以外の

穀粒中の貯蔵タンパクであり、これはグリアジンに相当し、一方でグルテリンは小麦以外の穀粒中の貯蔵タンパクであり、これはグルテニンに相当する。小麦貯蔵タンパクは、全種子タンパクの80% までを構成する（カサルダ(Kasarda), D.D.

等, (1976), Adv. Cer. Sci. Tech., 1:158-236; およびオズボーン (Osborne), T. B. 等, (1893), Amer. Chem. J., 15:392-471)。グルテニンおよびグリアジンはドウの形成、即ちパンの性能において重要であると考えられている。インビトロ実験から、種子貯蔵タンパクの溶解度が還元により増大することが示された (シェューリー (Shewry), P.R. 等, (1985), Adv. Cer. Sci. Tech., 7:1-83)。しかしながら、以前は、グルテニンおよびグリアジンの還元は、ドウの性能を改善するというよりも、寧ろその性能を低下するものと考えられていた (デイル (Dahle), L.K. 等, (1966), Cereal Chem., 43:682-688)。これは、多分化学的な還元剤による非特異的な還元が該ドウの脆弱化を生じたためである。

「生ドウ (Straight Dough)」および「予備醗酵 (Pre-Ferment)」法が、ドウおよび後の酵母醗酵パン製品の製造用の2つの主な公知法である。

該生ドウ法については、粉、水または他の液体、並びに酵母、粒状体、塩、ショートニング、砂糖、酵母栄養分、ドウコンディショナー、および保存剤等を包含し得る (これらに制限されない) 他のドウ成分の全てを混合して、ドウを形成し、部分的または完全な発生状態まで混合する。得られたドウを、特定の工程または所定の最終製品の特徴に依存して、ある期間に渡り醗酵させてもよい。

該製造工程の次の段階は、ベーキング、冷却および切りわけ後に、目標とする正味の重量を確実に達成するのに十分な重量をもつ適当なサイズの小片に、該ドウを機械的にまたは手作業で分割することである。次いで、このドウ小片を、しばしば丸め、かつ種々の長さの期間に渡り、静置 (中間的ねかし) させる。これは、該ドウをシート状にし、かつ成形調理する前に、「柔らかくする」ことを可能とする。その時間は、一般的に5-15分間であるが、特定の加工上の要求および処方に応じて大幅に変えることができる。該ドウの小片は、次に機械的にまたは手作業で適当な形状に成形し、かつ通常はベーキング前の最終的な「ねかし」処理に付される。次いで、このドウ小片は種々の時間、温度並びに蒸気状態の下でベーキング処理されて、所定の最終製品を得る。

上記の予備醗酵法においては、酵母を他の原料と組み合わせ、パンまたはロールパン用ドウの最終的な混合前に、種々の長さの時間に渡り醗酵させる。該シス

テムに対するベーকারのための期間は、「ウォーターブリュー (Water Brew)」、「リキッドファーマメント (Liquid Ferment)」、「リキッドスポンジ (Liquid Sponge)」および「スポンジ/ドウ (Sponge/Dough)」を含む。0-100%の範囲の割合の粉を、他の原材料と組み合わせ、ここで該他の原材料は、水、酵母、酵母栄養分およびドウコンディショナーを包含し得るがこれらに限定されず、また該組み合わせを、所定の期間、調製されたまたは周囲条件下で醗酵する。その典型的な時間は1-5 時間の範囲内である。即ち、この醗酵体はそのまま使用でき、あるいは後の使用のために大容量のタンクまたはトラフで冷却かつ保存することができる。残りの成分（粉、特徴的成分、付随的な添加物、追加の水等）を添加し、部分的または完全な発生状態まで混合する。

該ドウを、次に種々の期間に渡り醗酵させる。典型的には、幾分かの醗酵は、該残りの原材料の添加前に起こるので、必要とされる時間は最小（即ち、10-20 分）であるが、装置および製品の型に応じて変えられる。この第二の醗酵段階に引き続き、該ドウを上記生ドウ法におけるように処理する。

本明細書で使用する用語「ドウ混合物 (dough mixture)」とは、粉または粗い粉およびミルクまたは水等の液体を最少量で含有する混合物を意味する。

本明細書で使用する用語「ドウ (dough)」とは、粉または粗い粉およびミルクまたは水等の液体を最少量で含有する、弾性で柔軟なタンパクの網状構造をもつ混合物を意味する。

本明細書で使用する用語「ドウ原材料 (dough ingredient)」とは、任意の以下のような成分、即ち粉、水または他の液体、粒状物、酵母、スポンジ、塩、ショートニング、砂糖、酵母栄養分、ドウコンディショナーおよび保存剤等を包含するが、これらに限定されない。

本明細書で用いる用語「焼き製品 (baked good)」とは、あらゆる型のパン、酵母-醗酵および化学的醗酵並びに白パンおよびその他のパン並びにロールパン、イングリッシュマフィン、ケーキおよびクッキー、糖衣製品、クラッカー、ドーナッツ並びに他の甘味ペーストリー製品、パイおよびピザ皮、プレッツェル、ピタおよび他の扁平状パン、トルティーヤ、パスタ製品、および冷凍並びに冷蔵ド

ウ製品を包含するが、これらに制限されない。

チオレドキシンは粉中のアルブミンを還元するのに使用されているが、チオールレドックスタンパクはグルテニンおよびグリアジン、他の水不溶性貯蔵タンパクを還元するためにも、またドウおよび焼き製品の性能を改善するためにも利用されていない。チオールレドックスタンパクは、またグルテンの品位を改善し、結果的にその量を増大するためにも、また栽培穀類、例えば大麦、コーン、モロコシ、燕麦、キジおよび米または大豆粉からドウを作成するためにも使用されていない。

多くの穀物種子は、外来起源の酵素の阻害剤として機能することが示された幾つかのタンパクをも含有する。これらの酵素阻害剤は、幾つかの有害な生物に対する保護をもたらす可能性があることが示唆されている（ガルシアーオルメド(Garcia-Olmedo), F.等, (1987), Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology, 4:275-335; バーク(Birk), Y., (1976), Meth. Enzymol., 45:695-739; およびラスコースキー(Laskowski), M. Jr. 等, (1980), Ann. Rev. Biochem., 49:593-626)。2種のこのような酵素阻害剤は、アミラーゼ阻害剤およびトリプシン阻害剤である。更に、大麦タンパク阻害剤（本研究ではテストしていない）が同一の源由来の $\alpha$ -アミラーゼを阻害するという証拠がある（ウエスレーク(Weselake), R. J. 等, (1983), Plant Physiol., 72:809-812)。不幸にも、この阻害性タンパクは、しばしば幾つかの食品において望ましからぬ作用を生ずる。大豆中のトリプシン阻害剤、特にクニッツ(Kunitz)トリプシン阻害性(KTI)およびボーマン-バーク(Bowman-Birk)トリプシン阻害性(BBTI)タンパクを、まず不活性化した後、任意の大豆製品をヒトまたは家畜に摂取させる必要がある。これら2種の阻害性タンパクは、ホウ水素化ナトリウムにより化学的に還元した場合は、トリプシン阻害剤としては不活性となる（バーク(Birk), Y., (1985), Int. J. Peptide Protein Res., 25:113-131; およびバーク(Birk), Y., (1976), Meth. Enzymol., 45:695-739)。プロテアーゼを阻害する他のタンパクと同様に、これらの阻害剤は、分子内ジスルフィドを含み、通常は熱およびタンパク分解による不活性化に対して安定である（バーク, (1976)の上記文献ガルシアーオ

ルメドF.等(1987)の上記文献およびライアン(Ryan), (1980))。通常、該阻害剤によって引き起こされる悪影響を最小化するために、動物およびヒト用の食用製品中のこれら大豆トリプシン阻害剤および他のトリプシン阻害剤は、該食品を高温に曝すことによって処理している。しかしながら、この熱処理は阻害剤活性を十分に排除しない。更に、この方法は経費がかかるばかりでなく、重要な栄養価をもつ他のタンパクの多くを分解してしまう。例えば、120℃で30分の処理は大豆粉のBBITの完全な不活性化に導くが、元のKTI活性の約20%が維持される(フリードマン(Friedman)等, 1991)。阻害剤の完全な不活性化に必要とされる、長いまたはより高温での処理は、シスチン、アルギニンおよびリジン等のアミノ酸の分解をまねく(カエ(Chae)等, 1984; スクリードおよびクログダール(Skrede and Krogdahl), 1985)。

$\alpha$ -アミラーゼ活性を必要とする幾つかの工業的方法もある。その一例は、活性な $\alpha$ -アミラーゼを必要とする、大麦のモルト化である。大麦のアミラーゼ/ズブチリシン(asi)阻害剤およびチオールレドックスタンパク還元による他の穀類中のその等価物等の阻害剤の不活性化は、現在の手順によるよりも、 $\alpha$ -アミラーゼを迅速に十分に活性化し、結果としてモルト化および同様な工程に要する時間を短縮することを可能とするであろう。

チオールレドックスタンパクも、トリプシンまたはアミラーゼ阻害剤タンパクを不活性化する目的ではこれまでに使用されてはいない。クニッツおよびボーマン-パーク阻害性タンパク等のトリプシン阻害剤の還元は、その阻害作用を減ずる(マーク(Birk), Y., (1985), Int. J. Peptide Protein Res., 25:113-131)。

ヒトおよび家畜類による消費を意図した大豆製品中の該阻害剤の、チオールレドックス関連還元は、熱を必要としないか、あるいはタンパクの変性に現時点で必要とされるよりも低熱量を必要とし、結果として変性用のコストを節減し、かつ大豆タンパクの品位を改善するであろう。また、生理的な還元剤、所謂クリーン添加物(即ち、「有害な化学物質」と見做された成分を含まない添加剤)が、著しく望ましい。というのは、食品工業は化学添加剤に対する代用品を探し求めているからである。更に、チオールレドックスタンパク等の生理的還元剤により制御された様式で、粉の品位にとって重要な、該主要な小麦および種子貯蔵タンパ

ク（例えば、グリアジンおよびグルテニン）を選択的に還元する能力は、小麦およびライ麦由来のドウの諸特性を改善し、また他の粒状粉末、例えば穀物粉またはキャッサバまたは大豆粉由来のドウを生成する、ベーキング工業において有用である。

種子内乳または子葉（アシュトン(Ashton)等, 1976; ウェーバー(Weber)等, 1980) 中のタンパク本体内に収容されている、油-貯蔵型種子、例えばトウモロコシおよびブラジルナッツ(Brazil nut)(クライス(Kreis)等, 1989; ユール&ファング(Youle and Huang), 1981)に特徴的な2Sアルブミンタンパク群は、典型的には2つの分子間ジスルフィド結合により結合された異なるサブユニット（その一方は7~9 kDa であり、他方は3~4 kDa である）からなる。大きなサブユニットは2つの分子内ジスルフィド基を含み、小さなサブユニットはこれを全く含まない。該2Sの大きなサブユニットの分子内ジスルフィドは、大豆のボーマン-バーク阻害剤（クライス(Kreis)等, 1989) のものと類似性を示すが、2Sタンパクの生理的条件下で還元を行う能力に関する知見は、全く存在しない。

これらの2Sアルブミンタンパクはメチオニンに富んでいる。ブラジルナッツ2Sタンパクを生成するトランスジェニックな大豆が、最近生産された。このような大豆中の2Sタンパクの還元は、該大豆タンパクのドウ網状構造への組み込みを増強し、結果としてメチオニンに富む大豆粉パンを与える。更に、これら2Sタンパクは、しばしばアレルゲンとなる。この2Sタンパクの還元はそのアレルギー活性の節減をもたらすであろう。

プルラナーゼ(「脱分岐酵素」)は、穀類種子の内乳の澱粉を、加水分解的に $\alpha$ -1,6-結合を開裂することにより分解する酵素である。プルラナーゼは醗酵並びにベーキング工業にとって基本的な酵素である。プルラナーゼは、添加された砂糖または他の炭水化物の不在下で実施される、モルト化および幾つかのベーキング手順において、澱粉を分解するのに必要とされる。特にモルト形成工業においては、十分なプルラナーゼ活性を得ることが重要な問題である。しばしば、ジチオスレイトール(DTT、チオレドキシンの化学的な還元剤)が穀類処方物（例えば、大麦、燕麥および米粉）のプルラナーゼを活性化することが知られている。生理的に許容される系による、プルラナーゼの活性を十分に高めあるいは増大す

るための方法は、より一層迅速なモルト形成法を導きもたらし、また高い砂糖の利用性のために、高いアルコール含量を有する、ビール等のアルコール飲料の生成に導く可能性がある。

ヘビに噛まれた結果としての死および永久的な傷害は、多くのアフリカ、アジアおよび南アメリカ諸国における重大な問題となっており、また米国の幾つかの南部および西部地域の重大な関心事である。ヘビ由来の毒液は、分子内（鎖内）シスチン類、また幾つかの場合には分子間（連鎖間）シスチン類中に位置するジスルフィド(S-S)架橋を含む活性タンパク成分によって特徴付けられる。所定の毒素基内のシスチンの位置は高度に保存性のものである。毒性に関する分子内S-S結合の重要性は、これら基の還元が、そのマウス中での毒性の喪失に導いたことを示す報告から明らかである（ヤング(Yang), C.C., (1967), *Biochem. Biophys. Acta.*, 133:346-355; ハワード(Howard), B.C. 等, (1977), *Biochemistry*, 16:122-125)。ヘビ毒液の神経毒素は、運動神経末端からの神経伝達物質の放出性を変更する、およびシナプス前部またはシナプス後部作用型のタンパクである。ヘビ毒液の神経毒素の作用を被った個体に観察される共通の症状は、長期に渡る壊死および該個体の全身的な衰弱に加えて、腫れ、水腫および苦痛、卒倒または目眩、患部の痺れまたは疼き、痙攣、筋肉収縮、腎不全等を包含する。

該シナプス前部型の神経毒素は2つの組に分割される。第一の組、即ち $\beta$ -神経毒素は、3つの異なる組のタンパクを含み、その各々は高い保存性を示すホスホリパーゼA<sub>2</sub>成分を有する。ホスホリパーゼA<sub>2</sub>活性を担うこのタンパクは、6～7個のジスルフィド架橋をもつ。この $\beta$ -神経毒素群の構成員は一本鎖（例えばコードトキシン(caudotoxin)、ノテキシン(notexin)およびアグキストロドトキシン(agkistrodotoxin))または多重鎖（例えばクロトキシン(crotoxin)、セルレオトキシン(eruleotoxin)およびビペラトキシン(Vipera toxin))のいずれかである。2つのサブユニットで構成される $\beta$ -ブンガロトキシン( $\beta$ -bungarotoxin)は、第三の群を構成する。これらサブユニットの一つは、哺乳動物の膵臓由来のクニッツ型のプロテイナーゼ阻害剤と類似する。多重鎖 $\beta$ -神経毒素はイオンの結合したそのタンパク成分を含み、一方で $\beta$ -ブンガロトキシ

ンの2つのサブユニットは、分子間ジスルフィドによって共有結合的に結合している。同様に、哺乳動物の膵臓由来のクニッツ型のプロテイナーゼ阻害剤と類似する、 $\beta$ -ブンガロトキシンのB鎖サブユニットは、3つのジスルフィド結合をもつ。

該第二のシナプス前部毒素群、即ち促進型神経毒素は、酵素型の活性をもたずに、2つのサブグループを有する。第一のサブグループ、デンドロトキシンは、哺乳動物の膵臓由来のクニッツ型トリプシン阻害剤と類似し、かつ電圧感受性型のカリウムチャンネルを遮断する、57~60個のアミノ酸を含む単一のポリペプチド配列をもつ。第二のサブグループ、例えばファシクリン類(fasciculins)(例えば、ファシクリン1およびファシクリン2)は、コリンエステラーゼ阻害剤であり、かつそれ以外では広範な研究はなされていない。

シナプス後部神経毒素は長いおよび短い神経毒素の何れかとして分類されている。各々の型はS-S基を含むが、該ペプチドは固有のものであり、ホスホリパーゼA<sub>2</sub>または該クニッツまたはクニッツ型阻害性タンパクの何れにも類似していない。該短鎖神経毒素(例えば、エラプトキシン(erabutoxin) aおよびb)は、60~62個のアミノ酸残基に相当する長さをもち、かつ4つの分子内ジスルフィド結合を有する。該長鎖神経毒素(例えば $\alpha$ -ブンガロトキシンおよび $\alpha$ -コブラトキシン)は、65~74個の残基を含み、かつ5つの分子内ジスルフィド結合をもつ。もう一つの型の毒素、即ち細胞毒素はシナプス後部型として作用するが、その毒作用の様式は余り明らかにされていない。これらの細胞毒素は、原因不明の薬理学的効果、例えば溶血、細胞溶解および筋肉脱分極を示す。これらは上記の神経毒素よりも毒性が低い。これらの細胞毒素は、通常60個のアミノ酸と、4個の分子内ジスルフィド結合をもつ。ヘビ毒液の神経毒素の全ては、多重分子内ジスルフィド結合をもつ。

個々人の応急処置後に、有毒のヘビによる噛み傷の治療に使用される、通常のヘビ毒抗毒素は、主にウマの中で調製されたヘビ毒抗毒素の注射を包含する。有毒動物性中毒症後、どのていどの期間、該ヘビ毒抗毒素を投与でき、かつ効果的であるかは知られていないが、その使用は24時間までとすることを推奨する。ヘビ毒抗毒素による治療は、一般的に血漿、アルブミン、血小板または特定の血液



凝集因子の投与を伴う。更に、支持薬物、例えば抗生物質、抗ヒスタミン剤、抗破傷風薬物、鎮痛薬および鎮静薬等もしばしば投与される。幾つかの場合には、ショック、腎不全および呼吸器不全を最小化すべく、一般的治療法が採用される。噛み傷近傍へのカルシウム-EDTAの投与および傷領域の切開以外に、毒素の中和および血液系への毒素の取り込み防止をもたらす、局所的な公知の手段はない。これらの局所的治療法でさえも、その重要性が疑問視され、通常はウマ血清に対する個人の感受性に運命付けられている（ラッセル(Russell), F.E. (1983), ヘビ毒液中毒(Snake Venom Poisoning), NY州、グレートネックのスコラムインターナショナル社(Scholium International, Inc.))。

本明細書において規定する「個体(individual)」とは、動物またはヒトを意味する。

一般的に使用されているヘビ毒抗毒素の殆どは、ウマ血清に対して敏感な患者（患者の5%まで）におけるアレルギー反応以外にも、有害な副作用を生ずる可能性があるという意味から、問題である。非アレルギー性反応は発熱性ショックおよび補体欠乏を包含する（チッパー(Chippaur), J.-P.等, (1991), Reptile Venoms and Toxins, A.T. チュー(Tu)編, マルセルデッカー社, pp. 529-555)。

NADPH およびチオレドキシンリダクターゼの存在下で、チオレドキシンは、インビトロで、バクテリア神経毒素、破傷風およびボツリヌスAを還元することが示されている（シアボ(Schiavo), G.等, (1990), Infection and Immunity, 58:4136-4141; キストナー(Kistner), A.等, (1992), Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol., 345:227-234)。チオレドキシンは、破傷風毒素の連鎖間ジスルフィド結合の還元において有効であり、またかくして還元された破傷風毒素は、最早神経毒性をもたない（シアボ(Schiavo), G.等の上記文献）。しかしながら、ボツリヌスA毒素の連鎖間ジスルフィドのチオレドキシンによる還元は、より一層緩慢であることが報告されている（キストナー等の上記文献）。本発明に従って研究されたヘビの神経毒素とは対照的に、破傷風研究グループ（シアボ等の上記文献）は、該破傷風毒素について行った研究中に、チオレドキシンが毒素の連鎖内ジスルフィド結合を還元するという証拠を何等見出さなかった。また、ボツリヌスAを使用して実施した研究においても、チオレドキシンが連鎖内ジスルフィ

ドを還元することに関する証拠はなかった。該破傷風およびボツリヌスA毒素は、ヘビ毒が(1)低分子量を有し、(2)分子内ジスルフィド結合に富み、(3)トリプシンおよび他の動物プロテアーゼに対して耐性であり、(4)酵素的変更なしに、例えばタンパク分解による開裂なしに、活性であり、(5)多くの場合において、動物タンパク、例えばホスホリパーゼ $A_2$ およびクニッツ型プロテアーゼとの相同性を示し、(6)多くの場合において、分子間ジスルフィド結合に乏しく、しかも(7)熱およびプロテアーゼ等の試薬に対して安定である、という点においてヘビ神経毒素とはかなり異なるタンパクである。

1%の $\beta$ -メルカプトエタノールとの6時間のインキュベーションおよび8M尿素+300 mMの $\beta$ -メルカプトエタノールとのインキュベーションによる、インビトロでのヘビ毒素の還元による相互作用が、文献に報告されている(ハワード(Howard), B.D. 等, (1977), Biochemistry, 16:122-125; ヤング(Yang), C.C. (1967), Biochim. Biophys. Acta., 133:346-355)。しかしながら、これらの条件は生理的条件とは程遠い。毒素タンパクに関連して、本明細書で定義する用語「不活性化(inactivation)」とは、該毒素カルセプタと結合することが不可能であるという意味で、該毒素が、インビトロで最早生物学的に活性をもたないことを意味する。また、本明細書で使用する「無毒化(detoxification)」とは、該用語「不活性化」の拡張であり、動物毒性テストで決定されるように、個体中で該毒素が中和されていることを意味する。

ハチ毒は、少なくとも40個の別々の成分を含む複雑な混合物であり、メリチンおよびホスホリパーゼ $A_2$ などの主成分を含み、それぞれ該毒液全重量の50% および12% に及び、また微量成分として小型のタンパクおよびペプチド、酵素、アミンおよびアミノ酸をも含む。

メリチンは分子量2840をもつ、26個のアミノ酸残基からなるポリペプチドである。これはジスルフィド架橋を含まない。脂質-水境界に対するその高いアフィニティーのために、このタンパクは該細胞膜のリン脂質二重層を貫通し、その組織化された構造を乱す。メリチンは、それ自体は毒素ではないが、これが膜の構造を変更し、結果として該毒液中に存在するホスホリパーゼ $A_2$ 、他の主成分および主なアレルゲンのハイドロリチック(hydrolytic)活性を高める。

ハチ毒液のホスホリパーゼ $A_2$ は、128個のアミノ酸をもつ単一のポリペプチド鎖であり、4つのジスルフィドブリッジにより架橋されており、かつ炭水化物を含有する。このハチ毒液の主な毒性作用は、メリチンとの組み合わせにより達成される、ホスホリパーゼ $A_2$ の強力な加水分解活性によるものである。

ハチ毒液中の他の有害なタンパク質は、低分子量をもち、かつ重要な構造上の役割を演じていると考えられる、少なくとも2つのジスルフィド架橋を含む。これに包含されるものは、プロテアーゼ阻害剤(63-65アミノ酸)、MCDまたは401-ペプチド(22アミノ酸)およびアパミン(apamin)(18アミノ酸)である。

数千種のハチが存在するが、蜜蜂、アピスメリフェラ(*Apis mellifera*)のみがアレルギー反応の重大な原因となっている。その応答は、局所的な不快感から、全身的な反応、例えばショック、低血圧、呼吸困難、意識の喪失、喘鳴および／または死に至る可能性もある胸部緊縛等に及ぶ。これらの場合に利用されている唯一の治療は、エピネフリンの注射である。

ハチ刺傷の治療は、アレルギー反応を示す個体に対してのみ重要であるわけではない。「猛毒をもつ(killer)」またはアフリカ型のハチ、種々の蜜蜂は欧州型の蜜蜂よりもより一層攻撃的であり、南および北アメリカ両者において危険性がある。アフリカ型および欧州型の蜜蜂由来の毒液の致死性は、同一であると考えられ(シューマッハ(Schumacher), M.I. 等, (1989), *Nature*, 337:413)、営巣の挙動パターンは完全に異なっている。アフリカ型のハチは、コロニーの攪乱に対して、より迅速で、より多数のハチによるおよびより激しい針刺し攻撃で応答することが報告されている(コリンズ(Collins), A.M. 等, (1982), *Science*, 218:72-74)。アフリカ型のハチによる集団攻撃は、一個体に対して数千の刺し傷を形成する可能性があり、死に至らしめに可能性がある。この「猛毒をもつ」ハチは該アフリカ型のハチ(アピスメリフェラスクテラタ(*scutellata*))と、欧州型ハチ(アピスメリフェラメリフェラ(*mellifera*))間の交配の結果として発生する。アフリカ型のハチは、ブラジルにおいて、1956年に、より熱帯地方に適合した蜂蜜生産性を改善する目的で導入された。アフリカ型のハチは、南アメリカから北アメリカに移され、これらはテキサスおよびフロリダで報告されている。

世界の幾つかの地域、例えばメキシコ、ブラジル、北アフリカおよび中東にお

いては、サソリがヒトに対する生命の危機をもたらす。しかしながら、ブチダエ (Buthidae) (アンドロクトナスブタスセントルロイデスリユーラス & チテュス (Androctonus, Buthus, Centruroides, Leiurus and Tityus) 属) のみが、ヒトに対して有害である。サソリ毒液の化学的成分は、ヘビまたはハチ毒液程には複雑ではない。サソリの毒液はムコ多糖、少量のヒアルロニダーゼおよびホスホリパーゼ、低分子量分子、プロテアーゼ阻害剤、ヒスタミン放出剤および神経毒素、例えばセロトニン等を含む。これらの神経毒素は、神経筋接続部における、電圧感受性のイオンチャンネルに影響を与える。これらの神経毒素は3~4個のジスルフィド架橋をもつ基本的なポリペプチドであり、かつ2つの組に分類できる。即ち、アミノ酸61~70個をもつ、ナトリウムチャンネルを遮断するペプチドと、36~39個のアミノ酸をもつ、カリウムチャンネルを遮断するペプチドである。これら神経毒素上のジスルフィド架橋の、非一生理的還元剤、例えばDTT またはβメルカプトエタノール(ワット(Watt), D.D. 等, (1972), *Toxicon*, 10:173-181) による還元は、その毒性の喪失に導く。

有毒のサソリにより刺された動物の症状は、過度の興奮、呼吸困難、痙攣、麻痺、および死を包含する。現時点において、抗毒素はサソリ刺し傷に対する解毒薬のみである。この毒液の入手性が抗毒素の製造における主要な問題である。ヘビ毒液とは異なり、サソリの毒液は収集が極めて困難である。というのは、サソリ一匹当たりの毒液の収量が限られており、かつ幾つかの場合には、乾燥毒液の保存は、その毒性の変更に導く。抗毒素の製造における付随的な問題は、該神経毒素が極めて貧弱な抗原であることにある。

ヘビ、ハチおよびサソリ毒素の、生理的条件下での還元による不活性化は、報告されておらず、またチオールレドックス試薬、例えば還元したリボ酸、DTT または還元したチオレドキシンが、個体中におけるこれら毒液の解毒剤として機能できることを示唆している。

食物アレルギーも、国内的かつ国際的に重要な長年の問題である。12歳以下の子供の5%までおよび成人の1%が、米国において臨床的に影響を受けている(アドバースリアクションツーフード(Adverse Reactions to Foods)—AAAIおよびNIADリポート, 1984, NIH Pub. No. 84-2442, pp. 2,3)。幾つかの国々においては、

この数字は更に高く、また世界全体では、この問題は、特に幼児において増大しつつあると考えられている (T.マツダ (Matsuda) & R.ナカムラ (Nakamura), 1993 食品アレルギーの分子構造並びに免疫学的特性 (Molecular Structure and immunological properties of Food Allergens), Trends in Food Science & Technology, 4, 289-293)。この問題は広範囲の食品に及んでいる。食物アレルギーは、一般的に近年になって、トランスジェニック食品に関する懸念の結果として、上昇カーブを描いている。

ミルクは特に幼児において重大な問題である。小麦および大豆アレルギーは、新たな世代がこれらの食品を採用し、かつペット (特にドッグ) フードに高い関心が払われるようになってきていることから次第に重要性を増している。牛肉、米および卵も、多くの個体において重度のアレルギーを引き起こし、またペットフードに関しても重要となっている。

上記食品中の主要なアレルギー性タンパクの多くは、分子内ジスルフィド結合 (S-S) をもつが、2つの処理が工業的に適用される限りにおいて食品アレルギーは最小化される。即ち、(1)熱および(2)酵素によるタンパク分解。何れの場合も、単に部分的に成功するに過ぎない。熱処理は、アレルギー性を低下するが、最良の場合においてさえ、この問題を完全には排除しない。というのは、これに関与するタンパクが、典型的には熱安定性であるためである。更に、熱は栄養的に重要なアミノ酸、例えばリジン、システインおよびアルギニンを分解することにより製品の品位を低下する。酵素的なタンパク分解は、アレルギー性を低下する上で一層好都合であるが、通常望ましい食品特性、例えば風味等が失われ、また処理はコスト高である。従って、アレルギー性食品に適用した場合に、風味および栄養分の損失をもたらすことなしに、アレルギー性の減少または喪失をもたらすであろう生理的に安全な系が、極めて価値あるものであろう。

#### 発明の概要

本発明の一目的は、非チオニンシスチン含有タンパクを還元する方法を提供することにある。

本発明の第二の目的は、チオールレドックスタンパクを単独で、または還元剤

または還元系との組み合わせで使用して、粉または種子中に存在するグルテニンまたはグリアジンを還元する方法を提供することにある。

本発明の目的は、またチオールレドックスタンパクを単独で、または還元剤または還元系との組み合わせで使用して、ドウ強度および焼き製品の諸特性、例えば良好な崩壊性、該焼き製品の柔軟性およびより高いローフ体積(loaf volume)を改善する方法を提供することにある。

本発明の更なる目的は、このような方法を実施するのに有用な、チオールレドックスタンパクを含有する処方物を提供することにある。

更に他の本発明の目的は、米、コーン、大豆、大麦、燕麦、キャッサバ、モロコシまたはキビ粉からドウを生成する方法を提供することにある。

更に別の本発明の目的は、改善されたグルテンまたはグルテン様の製品を、小麦およびライ麦以外の栽培穀粒から製造する方法を提供することにある。

本発明の目的は、更にジスルフィド結合をもつ酵素阻害タンパクを還元する方法を提供することにある。

本発明のその他の目的は、チオレドキシンを発現または過剰発現するように、遺伝子操作された酵母細胞を提供することにある。

本発明の更に別の目的は、NADP-チオレドキシニンリダクターゼを発現または過剰発現するように、遺伝子操作された酵母細胞を提供することにある。

更に他の本発明の目的は、このような遺伝子操作された酵母細胞を使用して、ドウまたは焼き製品の性能を改良する方法を提供することにある。

本発明の更に別の目的は、一を越える分子内シスチンを含む非チオニン、非葉緑体タンパクの分子内ジスルフィド結合を還元する方法を提供するものであって、該方法は、シスチン含有タンパクを含む液体または物質に、チオールレドックスタンパクを添加する工程と、該チオールレドックスタンパクを還元する工程と、該シスチン含有タンパクを、該チオールレドックスタンパクによって還元する工程を含む。

もう一つの本発明の目的は、ジスルフィド結合を含有し、かつ8~15kDaの分子量を有する、単離したプルラナーゼ阻害性タンパクを提供することにある。

本発明の更に他の目的は、大麦または小麦内乳由来のプルラナーゼの活性を高

める方法を提供するものであり、該方法は、該プルラナーゼを含有する液体または物質にチオレドキシンを添加する工程と、該チオレドキシンを還元して、該プルラナーゼ活性を高める工程を含む。

更に他の本発明の目的は、一以上の分子内シスチンを有する動物毒液毒素タンパクを還元する方法を提供することにある。該方法は、該シスチン含有タンパクと、該タンパクを還元するのに有効な一定量のチオールレドックス(SH)試薬とを接触させる工程と、該接触を、該一以上の分子内シスチンの一以上のジスルフィドブリッジを還元して、該神経毒素タンパクを還元するのに十分な時間維持する工程を含む。該チオールレドックス(SH)試薬は、還元されたチオレドキシン、チオレドキシンの存在下で還元されたりボ酸、DTT またはチオレドキシンの存在下でのDTT であり得、また該ヘビ神経毒素タンパクが、シナプス前部またはシナプス後部神経毒素であり得る。

本発明の他の目的は、ヘビ神経毒素タンパクと、チオールレドックス(SH)試薬とを含有する組成物を提供することにある。

更に別の本発明の目的は、一以上の分子内シスチンを有する動物毒液毒素タンパクを還元する方法を提供することにある。該方法は、該タンパクと、一定量のNADP-チオレドキシンリダクターゼ、NADPH またはNADPH 発生系および該タンパクを還元するのに有効なチオレドキシンと接触させる工程と、該接触を該一以上の分子内シスチンの一以上のジスルフィドブリッジを還元して、該タンパクを還元するのに十分な時間維持する工程とを含む。

本発明の更に他の目的は、一以上の分子内シスチンをもつヘビ神経毒素を、インビトロで不活性化する方法を提供することにある。該方法は、該毒素を含有する液体に、チオールレドックス(SH)試薬を添加する工程を含み、ここで該試薬の量が、該毒素を還元するのに有効な量であることを特徴とする。

更に別の本発明の目的は、個体中の毒液の毒力に対処する方法を提供することにある。該方法は毒液毒性に冒された個体に、該毒液毒性を減じもしくは軽減するのに有効な量の、チオールレドックス(SH)試薬を投与する工程を含む。

本発明の上記目的に従えば、ドウの諸特性を改善する方法が提供され、該方法は、チオールレドックスタンパクと、ドウ成分とを混合して、ドウを生成し、該

ドウを焼くことを特徴とする。

また、上記本発明の目的に従えば、粒状食品生成物中の酵素阻害性タンパクを不活性化する方法が提供され、該方法は、チオールレドックスタンパクと、種子製品とを混合し、該チオールレドックスタンパクを還元剤または還元系により還元し、該酵素阻害剤を、該還元されたチオールレドックスタンパクで還元し、該酵素阻害剤の還元により該酵素阻害剤を不活性化することを特徴とする。

ここで使用するチオールレドックスタンパクは、チオレドキシンおよびグルタルレドキシンを含むことができる。このチオレドキシンは、E.コリチオレドキシン、チオレドキシンh、fおよびm並びに動物チオレドキシンを包含するが、これらに制限されない。ここで使用するチオレドキシンの還元剤は、リボ酸または還元系、例えばNADPチオレドキシンリダクターゼ(NTR)と組み合わせたNADPH等を含むことができる。グルタルレドキシンの還元剤は、還元系NADPHおよびグルタチオンリダクターゼと組み合わせた還元されたグルタチオンを含むことができる。NADPHはNADPH発生物質または発生物質、例えばグルコース6-ホスフェート、NADPおよび酵母等の源由来のグルコース6-ホスフェートデヒドロゲナーゼで置換することができる。このNADPH発生物質は、該ドウ製造工程の開始時点において、チオレドキシンおよびNADP-チオレドキシンリダクターゼと共に添加される。

本発明は、またシステイン含有タンパクを使用して実施することも可能であることに注意すべきである。該システインを先ず酸化し、次いでチオールレドックスタンパクを介して還元する。

更に、本発明の上記目的に従えば、アレルギー性食品タンパクのアレルゲン性を低下する方法が提供され、該方法は該タンパクと、所定量のチオレドキシン、NTRおよびNADPHまたはチオレドキシンの存在下で、該タンパクのアレルゲン性を減ずるのに有効な量のDTTと接触させ、工程(a)で接触させた該タンパクを動物に投与して、該動物が未処理の該タンパクを受け取った際に該動物中で発生するであろうアレルギー症状を軽減することを特徴とする。

本発明のもう一つの目的は、低アレルギー性の摂取可能な食品を提供することにある。この食品は、NTRおよびNADPHの存在下で、チオレドキシンで予備処理



することにより、低アレルギー性とされている。該食品は牛肉、ミルク、大豆、卵、米または小麦であり得る。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、大豆アレルギー性の抽出液を、還元したチオレドキシンで処理することによる、大豆アレルギーに対する皮膚テスト応答の緩和を示す棒グラフである。

第2図は、ミルクアレルギー性の抽出液を、還元したチオレドキシンで処理することによる、ミルクアレルギーに対する皮膚テスト応答の緩和を示す棒グラフである。

第3図は、小麦アレルギー性の抽出液を、還元したチオレドキシンで処理することによる、小麦アレルギーに対する皮膚テスト応答の緩和を示す棒グラフである。

第4図は、牛肉アレルギー性の抽出液を、室温にて、還元したチオレドキシンで処理することによる、牛肉アレルギーに対する皮膚テスト応答の緩和を示す棒グラフである。

第5図は、牛肉アレルギー性の抽出液を、37℃にて、還元したチオレドキシンで処理することによる、牛肉アレルギーに対する皮膚テスト応答の緩和を示す棒グラフである。

第6図は、食物を、還元したチオレドキシンで処理することによる、大豆および小麦に対する、胃腸管アレルギー応答の緩和を示す棒グラフである。

#### 発明の詳細な説明

この詳細な説明においては、以下の定義および略号を使用する。

CM	— 幾つかのパン小麦 $\alpha$ -アミラーゼ阻害剤
DSG	— マカロニ小麦から単離した幾つかの $\alpha$ -アミラーゼ阻害剤
DTNB	— 2',5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)
NTR	— NADP-チオレドキシンリダクターゼ
mBB	— モノブロモビマン(monobromobimane)
NADP-MDH	— NADP-マレートデヒドロゲナーゼ

FBP-アーゼ	ーフルクトース-1,6-ビスホスファターゼ
SDS	ードデシル硫酸ナトリウム
DTT	ージチオスレイトール
穀類	ーキビ、小麦、燕麦、大麦、米またはらい麦
BBTI	ーボーマン-バーク大豆トリプシン阻害剤
KTI	ークニッツ大豆トリプシン阻害剤
PAGE	ーポリアクリルアミドゲル電気泳動
TCA	ートリクロロ酢酸

### 酵素阻害性タンパクの実験

#### 出発材料

##### 材料

パン小麦 トリチカムエスティバム (*Triticum aestivum*)L, cv. タレント (Talent) ) およびマカロニ小麦 (トリチカムデュラム (*Triticum durum*)Desf., cv. モンデュール (Mondur)) の種子を研究室の貯蔵所から入手した。

##### 試薬

酵素アッセイ並びにドデシル硫酸ナトリウム (SDS)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動用の化学薬品および精密化学薬品は、それぞれシグマケミカル社 (Sigma Chemical Co.) およびバイオラドラボラトリーズ社 (BioRad Laboratories) から購入した。モノプロモビマン (mBB; 商品名チオライト (Thiolite)) はカルビオケム (Calbiochem) 社から購入した。他の化学薬品はそれぞれの製造元から入手し、入手可能な最高グレードのものであった。

##### 酵素

E. コリ由来のNTR およびチオレドキシンはアメリカンダイアグノスティックス社 (American Diagnostics, Inc.) から購入し、また各タンパクを過剰発現するように形質転換された細胞からも単離した。組み換えプラスミドpFP1を含むチオレ

ドキシン菌株は、Dr. J.-P. ジャコット (Jacquot) (ドゥラモットーゲリー (de la Motte-Guery), F. 等, (1991), Eur. J. Biochem., 196:287-294) から提供された。組み換えプラスミドpPMR21を含有するNTR 菌株は、親切にも、Drs. マージョ

リーラッセル&ピーターモデル(Marjorie Russel and Peter Model)(ラッセル(Russel),M. 等, (1988), J. Biol. Chem., 263:9015-9019)により、提供された。これらタンパクの単離のために使用した手順は、以下のような変更を加えた、これらの研究において記載されているものであった：細胞はりビ(Ribi)細胞分画装置内で25,000 psi にて破壊し、またNTR はフロレンチオ等 (フロレンチオ(Florencio),F.J.等, (1988), Arch. Biochem. Biophys., 266:496-507) によって記載されたようにして精製したが、レッドアガロース段階は使用しなかった。サッカロミセスセレビシアエ(*Saccharomyces cerevisiae*)(ペーカー酵母タイプ1)由来のチオレドキシンおよびNTR は、ほうれん草の葉についてフロレンチオ等により開発された手順に、以下の変更を加えて単離した。即ち、懸濁細胞(1部の細胞:5部のバッファー(v/v))をりビ細胞分画装置内に40,000 psiにて3回通すことにより破壊した。

チオレドキシンhおよびNTR は、ほうれん草の葉について開発された手順によって小麦胚芽から単離した (フロレンチオ(Florencio),F.J.等, (1988), Arch. Biochem. Biophys., 266:496-507) 。NADP-マレートデヒドロゲナーゼ(NADP-MDH)およびフルクトース-1,6-ビスホスファターゼ(FBPアーゼ)は、それぞれトウモロコシの葉 (ジャコット(Jacquot),J.-P. 等, (1981), Plant Physiol., 68:300-304) およびほうれん草 (クロフォード(Crawford),N.A. 等, (1989), Arch. Biochem. Biophys., 271:223-239) から精製した。E.コリ由来のグルタレドキシンおよび子牛胸腺チオレドキシンはホルムグレン(A. Holmgren)教授から入手した。

#### $\alpha$ -アミラーゼおよびトリプシン阻害剤

QM-1タンパクは、以前に記載されたように (コブレール(Kobrehel),K. 等, (1991), Cereal Chem., 68:1-6) 、パン小麦の粉のアルブミン-グロブリン画分から単離した。公開された手順は、またマカロニ小麦のグルテニン画分からの

DSG タンパク(DSG-1およびDSG-2)の単離のためにも利用した(コブレール(Kobrehel),K. 等, (1989), J. Sci. Food Agric., 48:441-452)。該QM-1、DSG-1 およびDSG-2 タンパクは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において均一であっ

た。トリプシン阻害剤は、コーン穀粒（これはフルカ(Fluca)から入手した）を除いて、シグマケミカル社(Sigma Chemical Co.)から購入した。全ての場合において市販の処方物は、SDS-PAGE（クーマシーブルー染色）において予想されたように泳動した、単一のタンパク成分を示したが、幾つかの処方については、該バンドはシャープではなかった。

#### 他のタンパク

パン小麦由来のピューロチオニン $\alpha$ およびマカロニ小麦由来のプピューロチオニン $\alpha$ -1および $\beta$ は、親切にもそれぞれDrs.D.D.カサルダ(Kasarda)およびB.L.ジョーンズ(Jones)から贈与された。このピューロチオニン $\alpha$ サンプルは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で調べたところ、ピューロチオニン群の2つの構成員を含有していた。該ピューロチオニン $\alpha$ -1および $\beta$ サンプルは、両者共にSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において均一であった。

#### ルーチン法の工程

#### 酵素活性化アッセイ

NADP-MDH、FBP アーゼ、NTR およびチオレドキシンhのアッセイ法は、指示したように僅かな変更を施した、フロレンチオ等の方法（フロレンチオ(Fiorencio), F.J.等, (1988), Arch. Biochem. Biophys., 266:496-507) に従った。酵素活性化アッセイについては、特に述べない限り、予備インキュベーション時間は20分とした。

#### mBBn蛍光標識およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動アッセイ

研究中のタンパクの直接的還元は、クローフォード等の方法（クローフォード(Crawford), N.A. 等, (1989), Arch. Biochem. Biophys., 271:223-239) の改良法によって実施した。該反応は、10mMのEDTAおよび16%のグリセロールを含有す

るpH7.1の100 mM磷酸カリウムバッファー(最終体積0.1ml)中で実施した。指示したように、0.7  $\mu$ g(0.1  $\mu$ M)のNTR および1  $\mu$ g(0.8  $\mu$ M)のチオレドキシン（両者共にE.コリ由来のもの）を、1 mMのNADPH および10  $\mu$ g(2-17  $\mu$ M)のターゲットタンパクを含有する70  $\mu$ lの該バッファー溶液に添加した。チオレドキシンをジチオスレイトール(DTT, 0.5mM)で還元する場合には、NADPH およびNTR は省略

した。還元したグルタチオンを使用したアッセイは、同様に実施したが、最終濃度は1 mMで実施した。20分間のインキュベーション後、100 nMのmBBBrを添加し、この反応を15分間継続した。この反応を停止し、かつ過剰のmBBBrを抜き出すために、10%SDS10  $\mu$  l および100 mMの $\beta$ -メルカプトエタノール10  $\mu$  l を添加し、該サンプルを次に該ゲルに適用した。グルタレドキシニンによる還元の場合、該チオレドキシニンおよびNTR を、1  $\mu$  g(0.8  $\mu$  M)のE.コリグルタレドキシニンで置換し、1.4  $\mu$  g(0.14  $\mu$  M)のほうれん草の葉から精製したグルタチオンリダクターゼ (フロレンチオ (Fiorencio), F.J. 等, (1988), Arch. Biochem. Biophys., 266:496-507) および1.5 mM NADPH を使用した。

ゲル(17.5% w/v, 厚み1.5mm)を、ラエムリ (Laemmli) (ラエムリ (Laemmli) U.K., (1970), Nature, 227:680-685) に従って調製し、定電流(9mA)にて16時間現像した。電気泳動に引き続き、ゲルを40% メタノールおよび10% 酢酸の溶液中に配置し、該溶液を数回交換しつつ、4~6時間浸漬した。次いで、クローフォード等の方法 (クローフォード (Crawford), N.A. 等, (1989), Arch. Biochem. Biophys., 271:223-239) に従って、ゲルを近紫外光を使用して蛍光バンドにつき調べ、かつ写真撮影した。最後に、ゲルをクーマシーブルーで染色し、かつ前に示したように脱染色した (クローフォード (Crawford), N.A. 等, (1989), Arch. Biochem. Biophys., 271:223-239)。

#### 標識タンパクの定量

テストタンパクの、該NADP-チオレドキシニン系による還元の程度を定量的指標を得るために、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で観測された蛍光バンドの強度を、クローフォード等の手順 (クローフォード (Crawford), N.A. 等, (1989), Arch. Biochem. Biophys., 271:223-239) の改良法を利用して、評価し

た。写真ネガを、ファルマーシアウルトラスキャン (Pharmacia Ultrascan) レーザー濃度計を使用して走査し、ピーク下部領域の面積を、各タンパクについて決定した標準曲線と比較することにより定量化した。該標準曲線の測定において、各タンパク (1~5  $\mu$  g の範囲内の濃度) は、0.5 mMのDTT の存在下で、100  $^{\circ}$ Cにて3分間加熱することにより還元した。mBBBrによる標識を、次に上記のように

して実施した（但し、該標準物質はSDSで反応を停止し、過剰のmBBRを $\beta$ -メルカプトエタノールで誘導体化した後に、100℃にて2分間加熱した）。該蛍光バンドの強度は添加されたタンパクの量に比例するので、使用した条件下で還元は完全であると推定された。

#### 実施例1： $\alpha$ -アミラーゼ阻害剤のチオレドキシン結合による還元

##### 酵素活性アッセイ

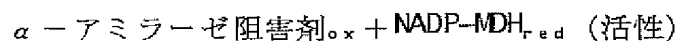
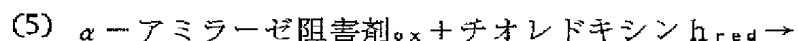
葉緑体酵素の活性化における特定のチオレドキシンの置換容量は、与えられたタンパクのチオール基の、可逆性のレドックス変化を行う能力についての一テストとなる。色素体外タンパクの場合においては生理的ではないが、このテストは幾つかの研究において有用であることが立証されている。その適例はピューロチオニンであり、これはチオレドキシンhで還元した場合、葉緑体FBPアーゼを活性化する（ワダ(Wada), K. 等, (1981), FEBS Lett., 124:237-240; およびジョンソン(Johnson), T.C. 等, (1987), Plant Physiol., 85:446-451)。生理的活性化剤がチオレドキシンfである、該FBPアーゼはチオレドキシンhによって影響を受けない。本実施例においては、シスチンに富むタンパクの、FBPアーゼおよびNADP-MDHを活性化する能力を、上記のようにテストした。マカロニ小麦の $\alpha$ -アミラーゼ(DSG-1およびDSG-2)は、酵素活性化において有効であることが分かっているが、これらはFBPアーゼではなくNADP-MDHに対する特異性を示すという意味から、ピューロチオニンとは違っていた（第1表）。該 $\alpha$ -アミラーゼ阻害剤は、還元されたチオレドキシンh（それ自体は、これらの条件下で大幅にNADP-MDHを活性化することはなかった）の存在下でのみ活性であった。DSG-1およびDSG-2はDTT-還元チオレドキシンhの存在下で、反応式(DTT  $\rightarrow$  チオレドキシン  $\rightarrow$  DSG  $\rightarrow$  NADP-MDH)に従って、NADP-マレートデヒドロゲナーゼを活性化した。

200  $\mu$ l の100mM トリス(Tris)-HClバッファー、pH7.9中に含まれた、活性化用の完全系は、10mMのDTT、0.7  $\mu$ gのコーン葉NADP-MDH、0.25  $\mu$ gの小麦チオレドキシンhおよび10  $\mu$ gのDSG-1またはDSG-2であった。一実験においては、20mMの $\beta$ -メルカプトエタノール( $\beta$ -MET)を、DTTの代わりに使用した。予備インキュベーション後、NADP-MDHを分光光学的にアッセイした。

この酵素活性化アッセイにおいて、チオレドキシン h は DTT で還元した。予想されるように、これら条件下では、有意な速度でチオレドキシンを還元しないモノチオール、例えば  $\beta$ -メルカプトエタノール ( $\beta$ -MET) (ジャコート (Jacquot), J.-P. 等, (1981), Plant Physiol., 68:300-304; ニシザワ (Nishizawa), A.N. 等, (1982), 「葉緑体分子生物学における方法 (Methods in Chloroplast Molecular Biology)」, (M. エーデルマン (Edelman), R.B. ハリック (Hallick) および N.-H. チュー (Chua) 編), pp. 707-714, エルセビアバイオメディカルプレス刊, NY; クローフォード (Crawford), N.A. 等, (1989), Arch. Biochem. Biophys., 271:223-239) は、DTT と置換しなかった。

NADP-MDH 活性は、一定のチオレドキシン h 濃度においては、添加された DSG-1 および DSG-2 の濃度に比例した。上記したものと同一の DTT 式を使用した。DSG-1 または DSG-2 の濃度を変更したことを除き、条件は上記と同様であった。一定の DSG 濃度でテストした場合、NADP-MDH は、チオレドキシン h の増大に伴って高い活性を示した。チオレドキシン h 濃度を変えた以外、条件は上記のものと同一であった。

CM-1、即ち DSG と同様であるが、低分子量をもつパン小麦タンパクも、NADP-MDH を活性化したが、第 1 表に示したように  $20 \mu\text{g}$  の CM-1 を使用した場合には FBP アーゼを活性化しなかった。この結果は、チオレドキシン h が種々の  $\alpha$ -アミラーゼ阻害剤を還元し、順に式 4 ~ 6 に従って NADP-MDH を活性化することを示す。これらのタンパクは、チオレドキシンの不在下で DTT を添加した場合には、酵素の活性化に対しては効果がなかった。



第1表：葉緑体NADP-マレートデヒドロゲナーゼおよびフルクトースビスホスファターゼの活性化における、チオレドキシン還元トリプシン阻害剤、チオニンおよび $\alpha$ -アミラーゼ阻害剤の有効性(DTT $\rightarrow$ チオレドキシン $\rightarrow$ 指定したタンパク $\rightarrow$ ターゲット酵素)

NADP-MDHの活性化を、本例において上記したように実施した。但し、DSG または他のテストしたタンパクの量は、 $20\mu\text{g}$ とした。FBP アーゼの活性化は、 $1\mu\text{g}$ のE. コリチオレドキシンおよび $20\mu\text{g}$ の指定したタンパクを使用して、標準的なDTT アッセイを利用してテストした。上記の値は、これら条件下でE. コリチオレドキシンについて観測された、制限された活性化に対して補正した。

<u>*活性, nkat/mgタンパク</u>	<u>M. kDa</u>	<u>S-S 基数</u>	<u>NADP-MDH</u>	
<u>FBP アーゼ</u>				
<u><math>\alpha</math>-アミラーゼ阻害剤</u>				
**DSG-2	17	5	2	0
**DSG-1	14	5	2	0
++CM-1	12	5	12	0
<u>トリプシン阻害剤</u>				
<u>シスチンに富む (植物)</u>				
コーン穀粒	12	5	5	0
大豆ボーマノーパーク	8	7	3	0
<u>他の型</u>				
オボムコイド	28	9	2	0
大豆クニッツ	20	2	2	0
オボインヒビター	49	14	1	0
ウシ肺 (アプロチニン)	7	3	痕跡	2



チオニン

**ピューロチオニン- $\alpha$ 1	6	4	1	39
**ピューロチオニン- $\beta$	6	4	痕跡	5
++ピューロチオニン- $\alpha$	6	4	0	14

\*: これらの値を、ほうれん草葉緑体のチオレドキシンm (NADP-MDH) およびチオレドキシンfを使用して得た対応する値、それぞれ40および550 と比較する。

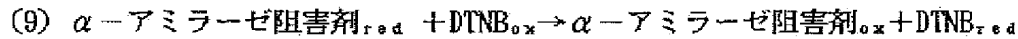
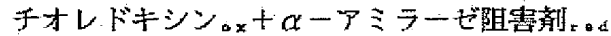
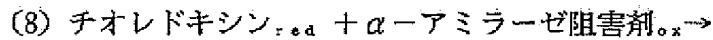
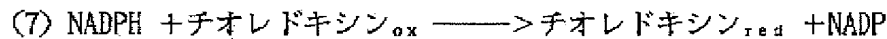
\*\* : マカロニ小麦由来のもの。

++ : パン小麦由来のもの。

実施例 2 : DTNB還元アッセイ

チオールレドックス活性に関する第二のテストは、412 nmにおける吸光度の増加により測定した、スルフヒドリル試薬、2',5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)の還元を触媒する能力である。ここで、アッセイしたタンパクは、NTR およびチオレドキシンを介してNADPH で還元された。このDTNBアッセイは、マカロニ小麦(DSG-1および2)およびパン小麦(CM-1)両者を由来とする $\alpha$ -アミラーゼ阻害剤に対して有効であることを明らかにした。NADP/チオレドキシン系(この場合、E.コリ由来のNTR およびチオレドキシンを使用した)により還元した場合には、DSG-1 またはDSG-2 は、DTNBの還元(NADPH  $\rightarrow$  NTR  $\rightarrow$  チオレドキシン  $\rightarrow$  DSG  $\rightarrow$  DTNB)を著しく促進した。このDTNBの還元アッセイは、10 $\mu$ g のチオレドキシンおよび10 $\mu$ g のNTR および20 $\mu$ g DSG-1 またはDSG-2 を使用して実施した。CM-1も、DTNBの還元アッセイにおいて有効であり、またNADP-MDHの活性化にみられるように(第1表)、DSG タンパクよりも検出の面から一層活性であった。CM-1アッセイに対する条件は、該DSG タンパクが省略され、かつピューロチオニン $\alpha$ を20 $\mu$ g、CM-1を20 $\mu$ g 使用した点を除き、該DSG/DTNBアッセイに対する条件と同一であった。これらの結果は、かくして実施例1における酵素活性化実験を確認しており、かつ該 $\alpha$ -アミラーゼ阻害剤が生理的に該NADP/チオレドキシン系によって還元されることを示している。これら条件の下で、DTNBの還元を促進する際における、該 $\alpha$ -アミラーゼ阻害剤の役割は、以下の式7~9にまとめられる。

## NTR



## 実施例3：タンパク還元率の測定

モノブロモビマン(mBBBr)の入手性および植物系でのその利用適正は、植物タンパクのスルフヒドリル基を測定するための新たな技術を与えた(クローフォード(Crawford), N.A.等, (1989), Arch. Biochem. Biophys., 271:223-239)。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法と組み合わせた場合に、mBBBrは、複雑な混合物においてさえ、レドックス活性タンパクの該スルフヒドリル状態における変動を定量化するのに利用できる。従って、該技術を該阻害性タンパクに適用して、チオレドキシンによる還元に関するその能力の確認を可能とした。ここで、テストタンパクはチオレドキシンにより還元され、該チオレドキシン自体は予めDTTまたはNADPH およびNTR によって還元されている。次いで、該還元タンパクのmBBBr誘導体を調製し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により、他の成分から分離し、かつその還元状態を蛍光により検査した。以下に記載する実験において、E.コリ由来のチオレドキシンは、該ターゲットタンパク各々の還元において有効であることが分かった。並行して行った実験は、チオレドキシンhおよび子牛胸腺チオレドキシンが、それぞれ種子および動物起源のタンパクを還元することを明らかにした。

該酵素活性の確認および染料還元実験において、DSG-1 はチオレドキシンの存在下で有効に還元された。インキュベーション後、該タンパクをmBBBrにより誘導体化し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後に、蛍光を可視化した。還元はDTT のみでは余り進行せず、GSH では有意な還元はみられなかった。チオレドキシンに対する同様な必要性が、CM-1およびDSG-2(データは提示せず)の還元において観測された。使用したチオレドキシンはE.コリ由来のものであったが、同様な結果が、小麦チオレドキシンhについて観測された。チオレドキシンは、また

DTT がNADPH およびNTR によって置換された場合にも必要とされる（データは提示せず）。

#### 実施例4：シスチンに富む植物トリプシン阻害剤の、チオレドキシシン関連性還元

小麦種子の主な可溶性シスチンに富むタンパクは、外因性の $\alpha$ -アミラーゼの阻害剤として機能できるが、多くの他の種子のシスチンに富むタンパクはこの活性に欠け、また幾つかの場合においては、動物起源のトリプシンの特異的阻害剤として作用する。これらのタンパクは強力な化学的な還元剤、例えばホウ水素化ナトリウムにより還元できる（バーク(Birk), Y.(1985), Int. J. Peptide Protein Res., 25:113-131; およびバール(Bird), Y.(1976), Meth. Enzymol., 45:695-7390)が、これらが生理的条件下で還元できることを示す証拠はない。このような理由から、トリプシン阻害剤を、チオレドキシシンにより還元される可能性をテストすることは興味あることであった。テストされた代表的なシスチンに富むものは、大豆ボーマン-バークおよびコーン穀粒トリプシン阻害剤を包含した。これら両者の場合の結果は正であった。即ち、各阻害剤は、DTT-還元チオレドキシシンの存在下で添加した場合（第1表）には、NADP-MDHを還元し（しかし、FBPアーゼは還元されなかった）、かつ各々はNADPH、NTR およびチオレドキシシンの存在下で、DTNBを還元した（データは提示せず）。

$\alpha$ -アミラーゼ阻害剤について見られたように、シスチンに富むトリプシン阻害剤のチオレドキシシン-依存性還元は、mBBBr/SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動技術により直接追跡できた。かくして、DTT による有意な還元が、著しく高い蛍光性の、高速で移動するバンドを示す該ボーマン-バーク(BBTI)、およびチオレドキシシンの背後で移動する高い蛍光性のバンドのコーン穀粒トリプシン阻害剤(CKTI)両者を使用した場合、還元されたチオレドキシシンの存在下でのみ観測された。

#### 実施例5：他のトリプシン阻害剤およびピューロチオニンのチオレドキシシン関連性還元

種子由来のシスチンに富むトリプシン阻害剤が、チオレドキシシンによる特異的な還元を行うことができるという発見から、他の型のトリプシン阻害剤タンパクが

この特性をもつか否かに関連する問題が生ずる。この研究中に、幾つかのこのような阻害剤、大豆クニッツ、ウシ肺のアプロチニン、卵白オボインヒビターおよびオボムコイドトリプシン阻害剤をテストした。テストしたパラメータは、上記のシスチンに富むタンパクに関する程広範ではなかったが、他のトリプシン阻害剤も、酵素活性化およびmBBR/SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測定されるように、チオレドキシンによって特異的に還元される能力を示すことが分かった。上記のシスチンに富むタンパクに関する場合にそうであったように、本研究のこの段階でテストした該トリプシン阻害剤（大豆クニッツおよび動物起源のトリプシン阻害剤）はNADP-MDHを活性化したが、FBP アーゼを活性化することとはなかった（第1表）。ウシ肺アプロチニンは、これがNADP-MDHよりも一層効果的にFBP アーゼを活性化する点で例外的であった。また、アプロチニンは、ここで研究した種子タンパクの幾つかと、これが高いシスチン含有率（約10%）を示す点において類似していることにも注目すべきである（カーゼル(Kassel), B. 等, (1965), Biochem. Biophys. Res. Commun., 20:463-468)。

これらタンパクの1種、即ち該クニッツの阻害剤のチオレドキシン関連性還元に係わる蛍光測定による証拠は、mBBR/SDS-ポリアクリルアミド電気泳動ゲル内の高度に蛍光性の低速泳動バンドにより示された。還元型において、該クニッツ阻害剤も、蛍光性の迅速泳動バンドを生じた。この低分子量種の特性は未知である。該ゲル上のその位置は、該クニッツ処方物中の不純物として存在するポーマナーバーク阻害剤を表す可能性があることを示唆している。しかしながら、このような成分は、クーマシーブルー染色SDS ゲルでは明確ではなかった。予想された分子量の単一の蛍光バンドを生ずる動物由来の阻害剤も、還元に対するチオレドキシン要求性を示した（データは提示せず）。

初期の結果の確認において、チオレドキシン還元ピュロチオニン $\alpha$ は、一貫してFBP アーゼおよび初期にテストした型のピュロチオニン $\alpha$ を活性化したが、NADP-MDH（第1表）を活性化しなかった（ワダ(Wada), K. 等, (1981), FEBS Lett., 124:237-240)。しかしながら、パン小麦由来のピュロチオニン $\alpha$ とは対照的に、前に検討されなかった2種のピュロチオニン（マカロニ小麦由来

のピューロチオニン  $\alpha$ -1 および  $\beta$ ) は、検出可能に NADP-MDH を活性化した (第 1 表)。これら 2 種のマカロニ小麦のピューロチオニンも、FBP アーゼを活性化する能力においては異なっていた。これらピューロチオニン間の活性の差異は、その高いアミノ酸配列における類似性 (ジョーンズ (Jones), B.L. 等, (1977), *Cereal Chem.*, 54:511-523) およびこれらのチオレドキシンによる還元を受ける能力における類似性から、予想されなかった。チオレドキシンに対する要求性は、ピューロチオニン (ここではその  $\alpha$ -型) の還元について、SDS-PAGE 蛍光処置により観測された。

#### 実施例 6 : 還元の定量化

上記実施例は、チオレドキシンが  $\alpha$ -アミラーゼを包含する種々のタンパク、例えば CM および DSG 阻害剤、および種子並びに動物起源のトリプシン阻害剤を還元することを立証している。定性的な意味では明白であるが、上記の結果は、還元 の程度に関する定量的な指標を何等与えてくれない。そこで、クローフォード等のプロトコール (クローフォード (Crawford), N.A. 等, (1989), *Arch. Biochem. Biophys.*, 271:223-239) に従って、一つの実験を実施した。

第 2 表に示すように、E. コリ NADP/チオレドキシン系による、種子阻害剤タンパクの還元 の程度は、時間-依存性であり、かつ該タンパクに依存して、2 時間後に 15~48% の還元率に達した。主なタンパク成分により発せられる蛍光に基づくこの結果は、チオレドキシンが、 $\alpha$ -アミラーゼおよびトリプシン阻害剤の還元において、触媒的に作用することを示している。添加されたチオレドキシンに対する、2 時間後に還元されたタンパクの比は最高に還元されたタンパク (大豆ボーマナーバークトリプシン阻害剤) および最小の還元率で還元されたタンパク (コーン穀粒トリプシン阻害剤) 両者について何れも 1 を越えていた。即ち、2 時間の還元期間後に該比はそれぞれ 7 および 2 であった。第 2 表中のこれらの値は標準的なアッセイ条件下で得たものであり、かつこれらの条件を変更することによる、還元を最適化する試みは行わなかったことに注意すべきである。

第 2 表 : mBBR/SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を利用した、NADP/チオ

### レドキシン系による、種子タンパクの還元程度

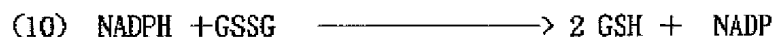
以下のタンパク濃度(nM)を使用した：チオレドキシン, 0.08; NTR, 0.01; ピューロチオニン- $\beta$ , 1.7; DSG-1, 0.7; コーン穀粒トリプシン阻害剤, 1.0; ボーマン-バークトリプシン阻害剤, 1.3; クニッツトリプシン阻害剤, 0.5。指定した時間差を除き、他の条件は実施例1～4と同一であった。

タンパク	20分後の%還元率	120 分後の%還元率
ピューロチオニン- $\beta$	15	32
DSG-1	22	38
コーン穀粒トリプシン阻害剤	3	15
ボーマン-バークトリプシン阻害剤	25	48
クニッツトリプシン阻害剤	14	22

### 実施例7：還元剤としてのE・コリグルタレドキシン

バクテリアおよび動物は、リボヌクレオチド還元等の反応において、チオレドキシンと置換できる、チオールレドックスタンパク、グルタレドキシンを含むことが知られている(ホルムグレン(Holmgren), A. (1985), Ann. Rev. Biochem., 54:237-271)。グルタレドキシンは式10および11に示したように還元される。

#### グルタチオン



#### リダクターゼ



グルタレドキシンが高級植物由来のタンパクと相互作用するという証拠は、いままでのところ存在しない。E・コリ由来のグルタレドキシンおよび一般的に研究途上にある種子タンパクを使用して、この能力をテストした。還元活性は、デンストメトリー走査と組み合わせた、mBBR/SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により追跡した。以前に記載した条件下で、全部ではないが、幾つかの場合において、グルタレドキシンが有効にチオレドキシンと置換できることが観測され

た。かくして、グルタレドキシンは以下の還元(数値は、E・コリチオレドキシンの

に相対的な還元率%を示す)において活性であることが分かった: DSG-1 および CM-1  $\alpha$ -アミラーゼ阻害剤(それぞれ、147 および210%); コーン穀粒トリプシン阻害剤(424%); およびプロチオニン ( $\alpha$ 、 $\alpha$  1 および  $\beta$  型に対してそれぞれ82、133および120%)。グルタレドキシンは、DSG-2  $\alpha$ -アミラーゼ阻害剤および該大豆ボーマンナーパークおよびクニッツトリプシン阻害剤の還元においては効果がなかった。動物起源のトリプシン阻害剤も、グルタレドキシンに対する複合的応答を示した。卵白オボインヒビターは効果的に還元されたが(E-コリチオレドキシンに対して55%の還元率)、卵白オボムコイド阻害剤およびウシ肺アプロチニンは、影響を受けなかった。重大なことに、以前に報告された(ベレシアク(Weleskiuk), R.A. 等, (1977), *Nature*, 266:565-567)ように、グルタレドキシンは、葉緑体、FBP アーゼおよびNADP-MDHのチオレドキシン-関連酵素の活性化において、即効性の還元剤として、チオレドキシンとは置換しなかった(データは提示せず)。

上記の実施例は、テストした幾つかの酵素阻害性タンパクがグルタレドキシン並びにチオレドキシンによって還元できることを立証している。チオレドキシンに特異的なものは、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害剤(DSG-2)、および幾つかのトリプシン阻害剤(クニッツ、ボーマンナーパーク、アプロチニン、およびオボムコイド阻害剤)を包含する。チオレドキシンまたはグルタレドキシンの何れかによって還元されるタンパクはピューロチオニン、2種の $\alpha$ -アミラーゼ阻害剤(DSG-1, CM-1)、植物由来のシスチンに富むトリプシン阻害剤(コーン穀粒阻害剤)、および動物由来のトリプシン阻害剤(卵白オボインヒビター)を包含する。これらの結果はグルタレドキシンが植物中に発生するか否かに関する問題を生ずる。グルタレドキシンは、緑藻中に存在する(ツァン(Tsang), M.L.-S. (1981), *Plant Physiology*, 68:1098-1104)が、高級植物中には存在しないことが報告されている。

第1表に示されたNADP-MDHおよびFBP アーゼターゲット酵素の活性は、生理的葉緑体タンパク(チオレドキシンmまたはf)による活性化後に見られる活性よりも相対的に低い、示された値は再現性があり、従って信頼できると考えられる。該阻害剤タンパクによって示された該酵素特異性は、生理的には相関性がな

いが、還元の際に達成された特定の構造を反映していると考えられると思われる。残されているのは、このような還元された構造が、種子および動物細胞内の機能と関連しているかどうかを知ることである。

このチオレドキシン（またはグルタレドキシン）に関連した還元事象の生理的な結果は、該ターゲットタンパクの機能が不明であるので、かなり興味あるものである。これらの結果は、新たな可能性を提供する。チオレドキシンが生理的条件下で広範囲のタンパクを還元するという事実は、区画的なバリアーのない状態で、細胞内で還元が生ずることを示唆している。

#### 実施例8：大豆食物中の大豆トリプシン阻害剤の不活性化

本実施例の目標は、大豆のボーマンバークおよびクニツトリプシン阻害剤を不活性化することにある。以下のプロトコールを動物飼料処方物に適用する。大豆食物10 gに、 $0.2 \mu\text{g}$  のチオレドキシン、 $0.1 \mu\text{g}$  のNADP-チオレドキシンリダクターゼおよび500 nMのNADPHを、1Mのトリス(Tris)-HClバッファー(pH 7.9)と共に添加して、5.25mlの30mMトリス-HClを得た。上記混合物を、室温にて約30分間放置する。該大豆トリプシン阻害剤の直接的還元を、以前に記載された(コブレール(Kobrehel), K. 等, (1991), J. Biol. Chem., 266:16135-16140)、mBBBr蛍光標識/SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を利用して測定した。トリプシン活性に関する処理粉の能力の分析はインシュリンおよびBAEE(Na-ベンゾイル-L-アルギニンエチルエステル)アッセイ(シュールマン(Schoellmann), G. 等, (1963), Biochemistry, 252:1963; ゴニアス(Gonias), S.L. 等, (1983), J. Biol. Chem., 258:14682)を利用して実施する。この分析から、このようにして該NADP/チオレドキシン系で処理した大豆食物が、トリプシンを阻害しないことを明らかにする。

#### 実施例9：穀類中の $\alpha$ -アミラーゼ阻害剤の不活性化

10 gの大麦モルトに、 $0.2 \mu\text{g}$  のチオレドキシン、 $0.1 \mu\text{g}$  のNADP-チオレドキシンリダクターゼおよび500 nMのNADPHを、1Mのトリス(Tris)-HClバッファー(pH 7.9)と共に添加して、5.25mlの30mMトリス-HClを得た。上記混合物を、室温にて約30分間放置する。該 $\alpha$ -アミラーゼ阻害剤の直接的還元を、以前に記載さ



れた(コブレール(Kobrehel), K. 等, (1991), J. Biol. Chem., 266:16135-16140)、mBBBr蛍光標識/SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いて測定した。 $\alpha$ -アミラーゼ活性を、澱粉からのマルトースの遊離を追跡することにより監視した(ベルンフェルド(Bernfeld), P. (1955), Methods in Enzymol., 1:149)。この分析から、このようにしてNADP/チオレドキシン系によって処理した小麦は $\alpha$ -アミラーゼを阻害しないことを確認する。

### 穀類タンパクの還元

#### 材料および方法

##### 植物材料

マカロニ小麦(トリチカムデュラム(Triticum durum), Desf. cv. モンロー(Monroe))の種子およびセモリナは、親切にもDr.K. カーン(Kahn)から贈与されたものであった。

##### 小麦種子の発芽

20~30粒の種子をプラスチック製のペトリ皿内の、5 mlの脱イオン水で湿潤させたファットマン(Whatman)#1 濾紙上に配置した。発芽は、暗室中で室温にて4日目まで行った。

##### 試薬/精化学薬品

生化学薬品および凍結乾燥した結合酵素はシグマケミカル社(Sigma Chemical Co.; MO 州、セントルイス)から入手した。E.コリチオレドキシンおよびNTR はアメリカンダイアグノスティカ社(American Diagnostica, Inc.; CT 州、グリーンウィッチ)から購入した。小麦チオレドキシンhおよびNTR は、ほうれん草の葉について開発された手順に従って、胚から単離した(フロレンチオ(Florencio), F.J. 等, (1988), Arch. Biochem. Biophys., 266:496-507)。E.コリグルタレドキシンは、親切にもA.ホルムグレン(Holmgren)教授から譲り受け

た。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動用の試薬は、バイオーラドラボラトリーズ(Bio-Rad Laboratories; CA 州、リッチモンド)から購入した。モノプロモビマン(mBBBr)即ちチオライト(Thiolite)は、カルビオケム社(Calbiochem Co.; CA 州、サンジェゴ)から入手した。乳酸アルミニウムおよびメチルグリーンはフ

ルカケミカル社 (Fluka Chemicals Co.; スイス、バクス) の製品であった。

#### グリアジンおよびゲルテニン

不溶性貯蔵タンパクの単離のために、セモリナ (0.2g) を、25℃にて指定した時間に渡り以下の溶液各 1 ml で順次抽出した：(1) 50mM トリス-HCl, pH 7.5 (20分); (2) 70% エタノール (2 時間); および (3) 0.1M 酢酸 (2時間)。抽出中、サンプルを電気式攪拌機上に置き、更に場合により渦流攪拌機で攪拌した。各溶媒で抽出した後、サンプルをエッペンドルフマイクロヒュージ (Eppendorf microfuge) で遠心処理 (12,000rpmにて 5 分間) し、上澄画分を分析の目的で保存した。各抽出操作間に、ペレットを 1 ml の水で洗浄し、前と同様な遠心処理によって回収し、また洗浄の際の上澄を捨てた。習慣に従って、該画分を以下のように命名した：(1) アルブミン/グロブリン；(2) グリアジン；および (3) ゲルテニン。

#### タンパクのインビトロ mBBR 標識

反応を 100 mM の トリス-HCl バッファー, pH 7.9 中で実施した。指示した如く、0.7  $\mu$ g の NTR および 1  $\mu$ g の チオレドキシン (特に述べない限り、両者共に E. コリ由来のものである) を、1 mM の NADPH および 10  $\mu$ g の ターゲットタンパクを含有するこのバッファー 70  $\mu$ l に添加した。チオレドキシンをジチオスレイトール (DTT) で還元し、NADPH および NTR を省略し、かつ DTT を 0.5 mM となるまで添加した。還元したグルタチオンを使用したアッセイは、同様にして実施したが、最終濃度は 1 mM とした。20 分間のインキュベーションの後、100 nM の mBBR を添加し、該反応を更に 15 分間続けた。該反応を停止し、かつ過剰の mBBR を誘導体化するために、10  $\mu$ l の 10% SDS および 10  $\mu$ l の 100 mM の  $\beta$ メルカプトエタノールを添加し、かつ該サンプルを次に該ゲルに適用した。グルタレドキシンによる還元のために、該チオレドキシンおよび NTR を、1  $\mu$ g の E. コリグルタレドキシン、

1.4  $\mu$ g のグルタチオンリダクターゼ (ほうれん草の葉から精製した) および 1.5 mM の NADPH により置換した。

#### タンパクのインビボ mBBR 標識

指示した時点において、乾燥した種子または発芽した幼苗 (同様な根の長さに基づいて選択) を該ペトリ皿から取り出し、その胚または発芽した軸を取り出し

た。各ロットからの5つの内乳を秤量し、次いで液体窒素中で乳鉢と乳棒を使用して粉碎した。100 mMのトリス-HClバッファー、pH7.9 中の2.0 mMmBBBr 1mlを、最後の痕跡の液体窒素が消失した直後に添加した。解凍したこの混合物を、次に更に1分粉碎し、マイクロビュージ管に移した。この懸濁液の体積を、適当なmBBBr溶液またはバッファー溶液で1 mlに調節した。アルブミン/グロブリン、グリアジンおよびグルテニンのタンパク画分を、上記のように発芽した幼苗の内乳から抽出した。これらの抽出したタンパク画分を使用するまで、-20℃にて保存した。各時点につき、バッファーのコントロールが含まれた。

#### SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

mBBBr-誘導体化されたサンプルのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、ラエムリ(Laemmli), U.K. (1970), *Nature*, 227:680-685 に記載されているように、15% ゲル中でpH8.5 にて実施した。厚み1.5 mmのゲルを一定電流、即ち9 mAにて16時間展開させた。

#### 自然のゲル電気泳動法

種々の型のグリアジンを分割するために、自然のポリアクリルアミドゲル電気泳動を、バシュク&ジルマン(Bushuk and Zillman) (バシュク(Bushuk), W. 等, (1978), *Can. J. Plant Sci.*, 58:505-515) により記載され、かつサピルシュタイン&バシュク(Sapirstein and Bushuk) (サピルシュタイン(Sapirstein), H.D. 等, (1985), *Cereal Chem.*, 62:372-377) により、垂直スラブゲルに対して改良されたように、6%ゲル (グリアジンを4種の型に分離するように工夫された手順) で実施した。最終体積100 ml中のゲル溶液は、6.0gのアクリルアミド、0.3g

のビスアクリルアミド、0.024gのアスコルビン酸、0.2 mgの硫酸第一鉄7水和物および0.25 gの乳酸アルミニウムを含んでいた。そのpHは乳酸で3.1 に調節した。このゲル溶液を2時間氷上でガス抜きし、次に0.5 mlの3%過酸化水素を、重合触媒として添加した。同様にpH3.1 に調節した運転バッファーは、1 l当たり0.5gの乳酸アルミニウムを含んでいた。電気泳動時間は一定電流50mAを使用した場合約4時間であった。電気泳動は、メチルグリーン追跡用色素でマークした、溶媒先端が該ゲル末端のから約1 cm手前まで移動した際に終了させた。

### mBBBr除去／蛍光写真法

電気泳動後、ゲルを12%(w/v)トリクロロ酢酸中に入れ、溶液を1回交換し、4～6時間浸漬して、該タンパクを固定化し、次いで該ゲルを40%メタノール/10%酢酸溶液に移して、8～10時間維持し、過剰のmBBBrを除去した。遊離並びにタンパクに結合したmBBBrの蛍光を、該ゲルを紫外光源(365 nm)を備えたライトボックス上に配置することにより可視化した。過剰(遊離)のmBBBrを除去した後、イエローラッテン(Wratten)ゼラチンフィルタNo.8(カットオフ波長: 460nm)を通して、ポラロイドポジティブ／ネガティブランドフィルム(Polaroid Positive/Negative Landfilm)タイプ55(f4.5での露光時間25～60秒)で、該ゲルの写真撮影を行った(クローフォード(Crawford), N.A.等, (1989), Arch. Biochem. Biophys., 271:223-239)。

### タンパク染色／脱染／写真撮影

SDS-ゲルを、前に記載されたように、40%メタノール/10%酢酸溶液中で1～2時間、クーマシーブリリアントブルーR-250で染色し、かつ一夜脱染した(クローフォード(Crawford), N.A.等, (1989), Arch. Biochem. Biophys., 271:223-239)。乳酸アルミニウム自然ゲルを、0.1gのクーマシーブリリアントブルーR-250(95%エタノール10ml中に溶解したもの)を、240 mlの12%トリクロロ酢酸中に含有し、濾過された溶液中で一夜、染色した。ゲルを12%トリクロロ酢酸中で一夜脱染した(バシユク(Bushuk), W. 等, (1978), Can. J. Plant Sci., 58:505-515およびサピルシュタイン(Sapirstein), H.D. 等, (1985), Cereal

Chem., 62:372-377)。

タンパク染色ゲルを、ポラロイドタイプ55フィルムで写真撮影して、プリントおよびネガを生成した。プリントを使用して、バンドの移動距離およびローディング効率を測定した。

蛍光ゲルのポラロイドネガおよび湿潤タンパク染色ゲルのプリントを、レーザー濃度計(ファルマーシア-LKBウルトロスキャン(Pharmacia-LKB UltroScan)XL)で走査した。ゲルスキャン(GelScan)XLソフトウェアを使用して、積算後にピーク面積を評価することにより、蛍光を定量した。

### 酵素アッセイ

以下の活性を、以前に記載された方法で、粗抽出液について測定した：ヘキソキナーゼ（バルダス(Baldus), B.等, (1981), *Phytochem.*, 20:1811-1814）、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、6-ホスホグルコネートデヒドロゲナーゼ（シュナールンベルガー(Schnarrenberger), C.等, (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, 154:438-448）、グルタチオンリダクターゼ、NTR およびチオレドキシンh（フロレンチオ(Florencio), F.J.等, (1988), *Arch. Biochem. Biophys.*, 266:496-507）。

### タンパク測定

バイオーラド(Bio-Rad)試薬およびウシ血清アルブミンを標準物質として使用して、ブラッドフォードの方法（ブラッドフォード(Bradford), M. (1976), *Anal. Biochem.*, 72:248-256)によって測定した。

### サブユニットの分子量測定

グリアジンおよびグルテニンのサブユニット分子量を、2組の分子量標準(kDa)を使用して、SDS-PAGEゲル上で評価した。第一の組はBSA(66)、オボアルブミン(45)、大豆トリプシン阻害剤(20.1)、ミオグロビン(17)、チトクロームc(12.4)およびアプロチニン(6.5)からなっていた。他方の組はバイオーラドプレステインドロー(BioRad Prestained Low)SDS-PAGE 標準であった。即ち、ホスホリ

ラーゼb(110)、BSA(84)、オボアルブミン(47)、カルボニックアンヒドラーゼ(33)、大豆トリプシン阻害剤(24)およびリゾチーム(16)。

### 実施例10：グリアジンの還元

一世紀前の、オズボーンとその共同研究者等の開拓的貢献の結果として、種子タンパクは、その水性並びに有機溶媒(20)中への溶解度に基づいて分画できる。小麦の場合、内乳の処方物（粉またはセモリナ）は、歴史的に、周期的に4種の溶液で抽出されて、示されたタンパク画分を与える：(i)水、アルブミン；(ii)塩水、グロブリン；(iii)エタノール/水、グリアジン；および(iv)酢酸/水、グルテニン。異なるタンパクが各画分中に豊富に存在することが、多数の証拠により示された。例えば、該アルブミンおよびグロブリン画分は、多数の酵素を含

み、また該グリアジンおよびグルテニン画分は、発芽に必要とされる貯蔵タンパク中にある。

上記の実施例1、4および5は、多数の水溶性種子タンパク（アルブミン/グロブリン、例えば $\alpha$ -アミラーゼ阻害剤、シスチンに富むトリプシン阻害剤、他のトリプシン阻害剤およびチオニン類）を記載している。これらは該種子自体またはE.コリ何れかに由来する、該NADP/チオレドキシン系によって還元される。該系の、小麦種子を由来とする、即ち該グリアジンおよびグルテニン画分に代表される不溶性貯蔵タンパクを還元する能力を、以下に記載する。指定した添加剤と共にインキュベーションした後、該グリアジンタンパクをmBBRにより誘導体化し、かつSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後に可視化した。この第一のグリアジンゲルにおける各レーンは以下の通りであった：1.コントロール：添加なし、2.GSH/GR/NADPH：還元グルタチオン、グルタチオンリダクターゼ（ほうれん草の葉由来のもの）およびNADPH、3.NGS:NADPH,還元グルタチオン、グルタチオンリダクターゼ（ほうれん草の葉由来のもの）およびグルタレドキシン（E.コリ由来のもの）、4.NTS:NADPH, NTR およびチオレドキシン（両タンパク共にE.コリ由来のもの）、5.MET/T(Ec): $\beta$ -メルカプトエタノールおよびチオレドキシン（E.コリ）、6.DTT、7.DTT/T(Ec):DTT およびチオレドキシン（E.コリ）、8.DTT/T(W):小麦チオレドキシンhを除き7と同一、9.NGS-グリアジン：グリア

ジンタンパク画分がないことを除き3と同様、10. NTS-グリアジン：グリアジンタンパク画分がないことを除き4と同様。mBBRとの反応性に基づき、該グリアジン画分は、チオレドキシンにより徹底的に還元された。還元を行う主要な構成員は25~45kDaの範囲のMrを示した。種子 $\alpha$ -アミラーゼおよびトリプシン阻害剤タンパクに関する実施例1、4および5に見られるように、該グリアジンは天然のhまたはE.コリ型のチオレドキシン（両者とも均一）により還元され、NADPH(およびNTR)またはDTTは、チオレドキシンに対する還元剤として機能する可能性があった。それ程広範ではない還元が、グルタチオンおよびグルタレドキシン（幾つかのE.コリおよび哺乳動物酵素系におけるチオレドキシンと置換し得るが、高級植物には存在することが知られていないタンパク）について観測された。

該グリアジン画分は、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ および $\omega$ と命名された4種の異なる型のタンパクで構成されており、これらは、酸性条件下での自然のポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離できる(バシュク(Bushuk), W. 等, (1978), *Can. J. Plant Sci.*, 58:505-515; カサルダ(Kasarda), D.D. 等, (1976), *Adv. Cer. Sci. Tech.*, 1:158-236; サピルシュタイン(Sapirstein), H.D. 等, (1985), *Cereal Chem.*, 62:372-377; およびターサム(Tatham), A.S. 等, (1990), *Adv. Cer. Sci. Tech.*, 10:1-78)。該 $\omega$ グリアジンを除き、各々の種はシスチン(S-S)基を含み、かくしてチオレドキシンによる還元の可能性をもつ。本研究においては、指定された添加剤とのインキュベーション後に、タンパクはmBBRにより誘導体化され、酸性-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後に可視化された。本研究における該第二のグリアジンゲルにおけるレーンは以下の通りであった：1. コントロール：添加なし、2. GSH：還元グルタチオン、3. GSH/GR/NADPH：還元グルタチオン、グルタチオンリダクターゼ(ほうれん草の葉由来のもの) およびNADPH、4. NGS：NADPH、還元グルタチオン、グルタチオンリダクターゼ(ほうれん草の葉由来のもの) およびグルタレドキシン(E. コリ由来のもの)、5. NGS+NTS：4 および6の組み合わせ、6. NTS：NADPH、NTR およびチオレドキシン(両タンパク共にE. コリ由来のもの)、7. MET/T(Ec)： $\beta$ -メルカプトエタノールおよびチオレドキシン(E. コリ由来)、8. DTT/T(Ec)：DTT およびチオレドキシン(E. コリ)、9. NTS(-

DT)：チオレドキシンがないことを除き6と同一、10. NGS+nts, -グリアジン：グリアジン画分がないことを除き5と同様。

チオレドキシン-還元グリアジン画分を、自然のゲル電気泳動にかけた場合、チオレドキシンにより最も特異的に還元されることが見出されたタンパクは、該 $\alpha$ 画分中に回収された。該 $\beta$ および $\gamma$ グリアジンの活発な還元が見られたが、第3表にまとめられた濃度計による測定結果から明らかな如く、これらの群中の還元は非-特異的、即ち比較的高いレベルの還元が、グルタチオンおよびグルタレドキシンによっても達成された。特に強力な還元は、DTT-還元チオレドキシンによる $\gamma$ グリアジンの還元であった。予想されるように、該 $\omega$ グリアジンの還元は見られなかった。この証拠は、チオレドキシン(自然のh型またはE. コリ由来の

もの)が、該グリアジンの幾つか、特に該 $\alpha$ 型のグリアジンを特異的に還元することを示す。

#### 実施例11: グルテニンの還元

チオレドキシンに対する応答についてテストした種子タンパクの残りの群、グルテニン(最低の水溶性を示すものであるが)は、恐らく最も興味あるものである。該グルテニンは何年にも渡り注目されてきたが、それは粉およびセモリナの調理性能についてのこれら物質の重要性のためである(マクリッチー(MacRitchie), F.等, (1990), Adv. Cer. Sci. Tech., 10:79-145)。従って、チオレドキシンの、この群のタンパクを還元する能力を調べるのが、この一般的な研究の主要な目標であった。

#### 第3表: 種々の型のグリアジンの還元剤特異性

該NADP/チオレドキシン系による還元後の、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ および凝集体ピーク下の面積は、それぞれ4.33、8.60、5.67および0.74吸光度単位 $\times$ mmであった。これらの組み合わせた面積は、第二のゲルによってチオレドキシンをDTTにより還元した場合(実施例10と同様な条件を使用)に観測される値の約65%であった。

#### 還元剤

#### グリアジン, %相対的還元率

	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	
凝集体 *	22.4	30.4	24.3	29.2
ナシ	36.4	68.1	60.6	60.1
グルタチオン	43.5	83.3	79.7	61.5
グルタレドキシン	100.0	100.0	100.0	100.0
チオレドキシン				

\*: タンパクは該ゲル内に侵入しない。

幾つかのグルテニンは、該mBBR/SDS-PAGE 技術を適用し、かつ実施例10において、第一のゲルについて示した条件を使用した場合に、特異的に還元された。最も徹底的な還元は、低分子量範囲(30—55kDa)で観測された。高分子量範囲で観測された還元は、余り顕著ではなかったが、依然として明白であり、特に100kDaおよびそれ以上において顕著であった。データは提示していないが、130kDa程度



の範囲においても還元は起こり得る。該グリアジンと同様に、該グルテニンの幾つかも、グルタチオンおよびグルタレドキシニンによって適当に還元された。しかしながら、全ての場合において、チオレドキシニンによる還元率が高く、また幾つかの場合においては、チオレドキシニンについて特異的であった（第4表の30-40および60-110kDaの範囲のタンパクに注目）。他のテストした小麦タンパクについて観測されたように、自然のhおよびE・コリ由来のチオレドキシニン両者が活性であり、かつNADPH および対応するNTR またはDTT の何れかにより還元できた。かくして、該グリアジンについて見られたように、幾つかのグルテニンはインビトロにて特異的にチオレドキシニンによって還元され、一方において、他のものはグルタチオンおよびグルタレドキシニンにより還元されるとはいえ、その効率は低かった。

表4  
グルテニンの還元剤特異性

DSG-1 または-2 $\alpha$ -アミラーゼインヒビターによるNADP-MDHの活性化に関するチオレドキシニンh濃度の効果の実施例1の研究のような反応条件

還元剤	グルテニン、相対的還元率* (%)		
	60-110 kDa	40-60 kDa	30-40
kDa			
なし	8	23	16
グルタチオン	31	51	29
グルタレドキシニン	50	72	40
チオレドキシニン*	100	100	100

\* NADP/ チオレドキシニン系による還元後の三つの分子量クラス（高分子量から低分子量まで）の下領域は1.5、5.67及び5.04であった。夫々、吸光度単位x ml数。

## 実施例12

### in vivo 還元実験

上記実施例は、チオレドキシンがin vitro試験された時に小麦グリアジンフラクション及びグルテニンフラクションの成分を特異的に還元することを実証する。しかしながら、その結果は、これらのタンパク質が発芽中にin vivoで還元されるか否かについて指示を与えない。その問題は、本発明者らの知る限りでは、従来取り組まれていなかった(Shutov, A.D.ら(1987), *Phytochem.* 26:1557-1566)。

この問題に答えるために、mBBR/SDS-PAGE 技術を適用して発芽種子中のタンパク質の還元状態を監視した。本発明者らは、オズボーンフラクション中の成分の還元が時間とともに次第に増大し、発芽の2日～3日後にピークに達することを観察した。観察された還元の増大はグリアジンでは2倍から、アルブミン/グロブリンでは3倍及びグルテニンでは5倍までの範囲であった。結果は、大半の小麦タンパク質グループの代表的なものが発芽中に還元されたが、正味の酸化還元変化がグルテニンで最大であったことを示唆する。

種子貯蔵タンパク質が発芽中に還元を受けるという新しい証拠を与えるが、結果は還元がどのように行われるのか、即ち、グルタチオンまたはチオレドキシンのいずれによるのかについて指示を与えない。この点に関する情報を得るために、主要なチオレドキシン結合されたグリアジン(30-50 kDa)及びグルテニン(30-40, 40-60 kDa)のin vivo還元レベルをin vitro測定から測定された還元(表4を参照のこと)と比較した。この目的のために、発芽中にin vivoで観察され、また適当な酵素還元系でin vitroで観察された蛍光染色されたタンパク質対クーマシー染色されたタンパク質の比を計算した。結果(主要なチオレドキシン結合されたグリアジンは25~45 kDaのMr範囲のものであり、またグルテニンは30~60 kDaのMr範囲のものであった)は、グルタチオンがグリアジンフラクションのin vivo還元のかなりの部分(90%まで)の原因であり得たが、これはその還元がチオレドキシンを必要とすると思われるグルテニンでは違ったことを示唆する。グルタチオン(またはグルタレドキシン)に起因し得る還元のレベルは発芽種子中で測定された還元されたグルテニンのレベルを説明するのには不十分であった。

### 実施例13

#### 酵素測定

また、チオレドキシン h の NTR 関連還元に必要なとされる NADPH の源を調べた。セモリナを、その他の系における NADPH の発生に機能する酵素、注目すべきは酸化的ホスフェート経路のデヒドロゲナーゼについて分析した。表5に要約された結果は、胚乳エキ스가この経路によりグルコースから NADPH を発生するのに必要とされる酵素：ヘキソキナーゼ、グルコース 6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ及び6-ホスホグルコネートデヒドロゲナーゼを含むという先の証拠(Tatham, A. S. ら (1990), Adv. Cer. Sci. Tech. 10:1-78)を確かめる。表5中に見られるグルコース 6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ活性は還元されたチオレドキシンに感受性ではなかったことは注目に値する(データは示されていない)。これに関して、胚乳酵素は葉からのその葉緑体相対物よりむしろそのシトゾル相対物に近似する(Fickenscher, K. ら (1986), Arch. Biochem. Biophys. 247:393-402; Buchanan, B.

B. (1991), Arch. Biochem. Biophys. 288:1-9; Scheibe, R. ら (1990), Arch. Biochem. Biophys. 274:290-297)。

粉を用いる先の結果(Johnson, T. C. ら (1987), Planta 171:321-331; Suske, G. ら (1979), Z. Naturforsch. C 34:214-221)から予想されるように、セモリナはまたチオレドキシン h 及び NTR を含んでいた(表5)。重要なことに、活性測定に基いて、NTR は試験した栽培品種からの製剤中の速度制限成分であることが明らかであった。

表 5

セモリナ中のチオレドキシン<sub>h</sub>の還元に影響する酵素の活性  
 (グルコース→Glu-6-P →6-P-グルコネート→NADP→チオレドキシン<sub>h</sub>)

タンパク質	活性 (nkat/mg タンパク質)
ヘキソキナーゼ	0.28
グルコース-6-Pデヒドロゲナーゼ	0.45
6-P-グルコネートデヒドロゲナーゼ	0.39
NTR	0.06
チオレドキシン <sub>h</sub>	0.35

これらの結果は、チオレドキシン<sub>h</sub>が小麦種子の発芽と関連する代謝プロセスを増進するためのシグナルとして機能することを示唆する。NTR 及びNADPH(酸化的ペントースホスフェート経路により発生された)によるその還元後に、チオレドキシン<sub>h</sub>は酵素の活性化に機能するだけではなく、貯蔵タンパク質の可動化(mobilization)に機能することが明らかである。

#### 実施例14

##### ドウ品質の改良

NADP/ チオレドキシン系を使用して粉タンパク質を還元することによりドウ品質を改良した。還元されたチオレドキシンは、タンパク質の異なる部分を架橋し、その折り畳まれた形状を安定化する硫黄-硫黄結合を特異的に分解する。これらの架橋が切断される時、そのタンパク質はパン中で展開してその他のタンパク質と結合して、ドウの弾性網状構造を形成するかみ合った格子を生じることができ。網状構造は醗酵プロセス中に酵母により生じた二酸化炭素を捕捉するのでドウが生じる。還元されたチオレドキシンは粉中でグリアジン及びグルテニンを活性化し、ドウを強化するような方法でそれらを組み合わせたことが提案される。還元されたチオレドキシンはドウ生産中に形成されたタンパク質網状構造を強化した。これらの試験 [フランス、モンペリエにある地方の製粉所から得られた

中間品質の小麦粉またはフランス、モンペリエにある地方の製粉所からまた得られた不良品質の小麦（この不良品質の小麦は主としてアポロ栽培品種である）10gを使用する] について、*E. coli*チオレドキシン0.2  $\mu$ g、*E. coli* NADP-チオレドキシン還元酵素0.1  $\mu$ g 及びNADPH 500 ナノモルを1Mのトリス-HCl、pH7.9 緩衝液と一緒に添加して30mMのトリス-HCl酵素系混合物5.25mlを得た。その酵素系混合物を30℃でマイクロファリノグラフ中で粉10g と混合することにより、その反応を行った。得られるファリノグラフ測定は、添加されたNADP/ チオレドキシン系によるドウの強化を示した。不良品質の粉では、ドウが還元系の存在下で形成された後に少なくとも4分間にわたって、ファリノグラフの読みが安定であったが、その読みはこの添加のない対照中のドウ形成の直後に低下した。改良効果は持続的であり、実験中に維持された。別の方法で表現すると、マイクロファリノグラフの読みは不良品質の小麦対照（酵素系を添加しなかった）によるドウ形成の7分後に375 プラベンダー単位であり、これに対しNADP/ チオレドキシン系の成分（NADPH、チオレドキシン及びNADP-チオレドキシン還元酵素）で処理された同不良品質の小麦について450 プラベンダー単位であった。

別のファリノグラフ研究をアポロ粉10g を用いて上記のようにして行い、NADPHの濃度のみがナノモルに代えて500  $\mu$ モルであった。ファリノグラフ測定は、この量のNADPH がまたドウの品質の明らかな改良をもたらすことを示した。

ドウの更に高いファリノグラフ測定は改良されたドウ強度及び改良されたベーキングされた良好な特性、例えば、良好なクラム品質、改良された口当たり及び

高いローフ体積に相当する。また、単離されたタンパク質を用いる *in vivo* 分析に基いて、天然小麦種子NADP/ チオレドキシン系はまたドウを強化するのに有効であろう。

本発明のベーキング局面及びその他の局面の目的のために、約0.1 ~ 3.0  $\mu$ g の範囲のチオレドキシン（好ましくは*E. coli*またはチオレドキシン<sub>h</sub>）及び約0.1 ~ 2.0  $\mu$ g の還元酵素及び約30~500 ナノモルのNADPH を粉約10g 毎につき添加する。チオレドキシン及び還元酵素の最適レベルは粉品質に依存する。一般に、粉の品質が高い程、必要とされるチオレドキシン及び還元酵素のレベルが高い

。また、チオレドキシンはNADPH/NADP- チオレドキシン還元酵素還元系に代えてリボ酸により還元し得る。次いでミルクまたは水の如きその他のドウ成分が添加される。しかしながら、その液体は最初にNTR/チオレドキシン系に添加され、次いで粉に添加されてもよい。パン種の目的のための酵母は、還元されたチオレドキシンが貯蔵タンパク質を還元する機会を有した後に添加されることが好ましい。次いでドウが生パン醗酵され、成形されたり等したレギュラードウとして処理され、ベーキングされる。

NADPH はこの実施例並びに以下の実施例において100  $\mu$ モルのグルコース6-ホスフェート、100  $\mu$ モルのNADP及び酵母の如き源からの0.05単位(0.2  $\mu$ g)のグルコース6-ホスフェートデヒドロゲナーゼからなるNADPH 発生剤の如きNADPH 発生剤で置換し得る。NADPH 発生剤はドウ生産プロセスの開始時にチオレドキシン及びNADP- チオレドキシン還元酵素と一緒に添加される。

アポロ栽培品種(CV)小麦10g を4.25mlのH<sub>2</sub>O 及び0.90mlのトリス-HCl(30mM、pH7.9)に含まれた20  $\mu$ l のNADP (25mM)、20  $\mu$ l のG6P(25mM)、0.25  $\mu$ g のG6PDase、0.1  $\mu$ g のNTR 及び0.2  $\mu$ g のチオレドキシンhと反応させた時に、更に高いファリノグラフ測定を得た。また、アポロ小麦10g をNTR またはチオレドキシンを含まない以外はこの同じ反応混合物と反応させた時に、更に高いファリノグラフ測定を得た。

### 実施例15

#### 小麦パンベーキング研究

コンピューターで監視したパナソニック(PANASONIC)ベーキング装置を使用することにより、ベーキング試験を行った。

パンの組成：

対照：

粉*：	200g (乾燥)
水：	70% 水和(hydration)
塩 (NaCl)：	5.3g
酵母：	4.8g(サッカロミセス・セレビジアエ、SafInstant)(乾燥酵母粉)

末)

\* 粉サンプルを対照的なベーキング品質を有する純粋なパン小麦栽培品種（不良～良好なベーキング品質を有する動物飼料銘柄及びその他の銘柄を含む）から得た。

#### アッセイ

アッセイ用のドウは対照の成分十示されるような種々の量のNADPチオレドキシン系(NTS)及び／またはNADP発生系を全て含んでいた。

#### 実験条件

—粉及び塩を計量し、混合する。

—70%の水和に達するのに必要とされる容積の水をベーキングパンに入れた。

—粉及び塩の混合物を水に添加し、コンピューターにより監視したベーキングプログラムを開始した。完結プログラムは3時間9分7秒続いた。

—アッセイの場合、酵素系成分を粉-塩混合物の添加の前に水に添加する。

—20分3秒混合した後、酵母を自動的に添加した。

パナソニック装置を監視するプログラムは以下のとおりであった。

<u>セグメント</u>	<u>期間</u>	<u>混合条件</u>	<u>加熱</u>
混合	00:00:03	T1	オフ
混合	00:05:00	T2	オフ
混合	00:05:00	T1	オフ
静止	00:10:00	T0	オフ
混合	00:17:00	T2	オフ
混合	00:07:00	T1	オフ
静止	00:30:00	T0	32°Cに達する
混合	00:00:04	T1	32°C
静止	01:15:00	T0	32°C
ベーキング	00:14:00	T0	180 °Cに達する
ベーキング	00:26:00	T0	180 °C

混合条件：T0= 混合しない（モーター停止）

T1= 通常の混合

T2= 交互に3秒混合、3秒静止

パンローフ体積をベーキングの終了時（その時にパンローフは室温に達する）に測定した。

#### 栽培品種テシー (THESEE) アッセイ

フランス小麦栽培品種テシーは良好な製パン品質を有するものとして分類される。下記の表6はアッセイの結果を示す。



表 6

	NADPH ( $\mu$ モル)	NTR ( $\mu$ g)	Th ( $\mu$ g)	ローフ体積	
				相対 ( $\text{cm}^3$ )	単位
対照	0	0	0	1690	100
サンプル	6.0	30	60	1810	107
	6.0	30	0	1725	102
	6.0	0	60	1720	102
	6.0	0	0	1550	92
	0	30	60	1800	107
*NADPH					
発生系		30	60	1620	96
*NADPH					
発生系+					
ATP、グルコース		30	60	1630	96
NTR 及び					
酵母からの					
Th	6.0	9.4	20	1750	104
*NADPH 発生系、ATP 及びグルコースの組成					
				添加した容積	
NADP、25ミリモル				700 $\mu$ l (17.5 $\mu$ モル)	
グルコース-6- ホスフェート、25ミリモル				700 $\mu$ l (17.5 $\mu$ モル)	
グルコース-6- ホスフェート					
デヒドロゲナーゼ(50 $\mu$ g/ml)				175 $\mu$ l (8.75 $\mu$ g)	
ATP、25ミリモル				700 $\mu$ l (17.5 $\mu$ モル)	
グルコース、25ミリモル				700 $\mu$ l (17.5 $\mu$ モル)	

表 6 に示されるように、6.0  $\mu$ モルの NADPH、30  $\mu$ g の NTR 及び 60  $\mu$ g の Th の濃度の完全 NTS を使用してテシー粉 200g からのローフをこの実施例に上記された

量及び条件でベーキングした時、増大されたローフ体積を得た。特にことわらない限り、NTR 及びチオレドキシン(th)はE.coliからのものであった。発生系を使用した時またはNTR もしくはThのいずれかを省いた時に、同様の増大が起こらなかった。また、系中の成分の量が上記の量の約半分以下であった時に、ローフ体積に関する有意な効果が生じなかった。

#### 栽培品種アポロアッセイ

このフランス小麦栽培品種は不良な製パン品質を有するものとして分類される。このアッセイに使用したNTR 及びチオレドキシンはE.coliからのものであった。表7はアポロ粉200gを使用するこのアッセイの結果を示す。再度、特にことわらない限り、量及び条件はその実施例の最初に上記されたものである。

表7

	NADPH ( $\mu$ モル)	NTR ( $\mu$ g)	Th ( $\mu$ g)	ローフ体積	
				絶対 ( $\text{cm}^3$ )	相対 単位
対照	0	0	0	1400	100
サンプル	6.0	30	60	1475	105
*NADPH					
発生系+					
ATP、グルコース		30	60	1530	109
*NADPH					
発生系+					
ATP、グルコース		0	0	1480	102
*NADPH					
発生系		6	0	1430	102
*NADPH					
発生系		6	7	1440	103

\*発生系、ATP 及びグルコースの組成は表6に記載のとおりである。

### 栽培品種アーボン (ARBON) アッセイ

フランス小麦栽培品種アーボンは飼料用に使用され、製パンに不適として分類される。下記の表8及び9は、その実施例の最初に記載されるドウ成分及び条件を用いてNTS またはNADPH 及びNTR を使用して、改良されたパンローフ体積が得られることを示す。そのアッセイに使用したNTR、チオレドキシン、NADPH 及びNADPH 発生系成分の量が表8及び9に示される。表9に示されたような完全NTSを使用するアーボンパン品質の改良が、対照と比較した時に明らかに見られた。

表 8

	NADPH	NTR	Th	<u>ローフ体積</u>
	<u>(<math>\mu</math>モル)</u>	<u>(<math>\mu</math>g)</u>	<u>(<math>\mu</math>g)</u>	<u>(<math>\text{cm}^3</math>)</u>
対照	0	0	0	1350
サンプル	0.1-0.6	3-4	3-4	対照より 20%まで高い
	>2.0	>20	>20	対照より小さい

表 9

<u>処理</u>	<u>ローフ体積</u>	
	<u>(cm<sup>3</sup>)</u>	<u>相対 単位</u>
完全NTS	1650	122
マイナスチオレドキシン	1690	125
マイナスNTR	1520	113
マイナスチオレドキシン、NTR	1540	114
マイナスNADPH	1440	107
マイナスNADPH、プラス *NADPH		
発生系	1560	116
マイナスNTS(対照)	1350	100

NADPH、0.6  $\mu$ モル

チオレドキシン、3.5  $\mu$ g

NTR、3  $\mu$ g

\*発生系：

3.5  $\mu$ モルのNADP

3.5  $\mu$ モルのグルコース-6-ホスフェート

1.75  $\mu$ g のグルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ

#### 実施例16

##### トリチカル(Triticale)パンベーキング研究

トリチカルは小麦／ライ麦雑種であり、一般にニワトリ飼料に使用される。それは小麦よりも栄養があるが、一般には特に開発国で製パンに適しないと考えられている。従って、トリチカル粉からベーキングされたローフに関するNTS系及びその変化の効果を研究した。特にことわらない限り、ベーキング条件及びドウ成分は実施例15に小麦粉について記載されたとおりであった。表10に示されるよ

うに、トリチカルドウがその表に示された量のチオレドキシン、NTR 及びNADPH 発生系を含んでいた時に、ローフ体積の改良がある。しかしながら、NTS(即ち、チオレドキシン、NTR 及びNADPH)が使用された時に、相当する改良が見られなかった。表10に示されたNTR、Th及びNADPH 発生系が使用された時に、パンを凝集性かつ安定にする、パンの口当たりの改良がまた生じた。

表10

トリチカル粉からベーキングされたローフに関するNADP/ チオレドキシン系(NTS)の効果

<u>処理</u>	<u>ローフ体積</u>	
	<u>(cm<sup>3</sup>)</u>	<u>相対 単位</u>
完全NTS	1230	94
マイナスNTS(対照)	1310	100
マイナスNADPH、プラス *NADPH 発生系	1390	106

NADPH、0.6  $\mu$ モル

チオレドキシン、3.5  $\mu$ g

NTR、3.0  $\mu$ g

発生系：

4.5  $\mu$ モルのNADP

4.5  $\mu$ モルのグルコース-6- ホスフェート

4.5  $\mu$ g のグルコース-6- ホスフェートデヒドロゲナーゼ

#### 実施例17

また、モロコシ、トウモロコシ及び米からの粉に関するNADPH/チオレドキシン系の効果を測定した。ベーキング条件は実施例15に小麦粉について記載されたとおりであった。このアッセイに使用したNTSの成分の量は以下のとおりであった

。8  $\mu$ モルのNADPH、40.5  $\mu$ g のNTR 及び54  $\mu$ g のチオレドキシン。チオレドキシン及びNTR の両方はE.coliからのものであった。NTS、特にトウモロコシ及びモロコシを含むこの研究のパンは改良された口当たり及び安定性を示した。

### 実施例18

トリチカル、ライ麦、大麦、エンバク、米、モロコシ、トウモロコシ及びテフからのエタノール可溶性貯蔵タンパク質及びミリステート可溶性貯蔵タンパク質の還元

特にことわらない限り、この実施例に使用した材料及び方法は“穀物タンパク質、材料及び方法”と題する節に上記されたものに従う。

トリチカル、ライ麦、大麦、エンバク及びテフ

反応を30mMのトリス-HCl緩衝液、pH7.9 中で行った。示されるように、E.coliからのNTR 0.7  $\mu$ g 及びチオレドキシン1  $\mu$ g または同定された酵母からのチオレドキシン2  $\mu$ g を、1 mMのNADPH 及び抽出された貯蔵タンパク質25~30  $\mu$ g を含むこの緩衝液70  $\mu$ L に添加した。エタノールで抽出された貯蔵タンパク質を、粉10g 毎に70%エタノール50mlを使用し、2時間抽出することにより得た。テフの場合、粉砕した種子200gを抽出した。ミリステートで抽出されたタンパク質を、粉1g を蒸留H<sub>2</sub>O 5 ml中のミリスチン酸ナトリウム8 mgで2時間抽出することにより得た。NADPH、NTR 及びチオレドキシンの組み合わせはNADP/チオレドキシン系(NTS)として知られる。示されるように、グルタチオン(GSH)2.5 mMを1.5 mMのNADPH 及び1.4  $\mu$ g のハウレンソウの葉グルタチオン還元酵素の不在(GSH)または存在(GR/GSH/NADPH)下で還元剤として添加した。20分間のインキュベーション後に、100nモルのmBBRを添加し、その反応を更に15分間続けた。反応を停止し、過剰のmBBRを誘導体化するために、10% SDS10  $\mu$ L 及び100 mMの2-メルカプトエタノール10  $\mu$ L を添加し、次いでサンプルをゲルに適用した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に関する操作はN.A.Crawfordら(1989 Arch.Biochem.Biophys. 271:223-239)により記載されたとおりであった。

米、モロコシ及びトウモロコシ

反応を30mMのトリス-HCl緩衝液、pH7.9 中で行った。タンパク質をチオレドキ

シンにより還元した時、下記の成分を緩衝液70 $\mu$ Lに添加した。1.2 mMのNADPH、10~30 $\mu$ gの種子タンパク質フラクション、0.5 $\mu$ gのE.coli NTR及び1 $\mu$ gの

E.coliチオレドキシン。グルタチオンによる還元のために、チオレドキシン及びNTRを2.5 mMの還元されたグルタチオン及び1 $\mu$ gのグルタチオン還元酵素（ペーカールの酵母、シグマ・ケミカル社）で置換した。ジチオスレイトールによる還元のために、NADPH、チオレドキシン、及びNTRを省き、0.5 mMのジチオスレイトールを添加した。全ての場合、インキュベーション時間は20分であった。次いで10 $\mu$ Lの10mMのmBBBr溶液を添加し、反応を更に15分間続けた。反応を停止し、過剰のmBBBrを誘導体化するために、10% SDS 10 $\mu$ L及び100 mMの2-メルカプトエタノール10 $\mu$ Lを添加し、サンプルをゲルに適用した。夫々の場合、抽出されたタンパク質を得るために、1 gの粉碎した種子を5 mlの蒸留水中ミリスチン酸ナトリウム 8 mgで抽出した。タンパク質の初期の酸化還元状態測定を除いて、サンプルを22℃で2時間にわたって抽出し、次いでmBBBrの添加の前に16,000rpmで20分間にわたって遠心分離した。初期の酸化還元状態測定では、mBBBrをミリスチートと共に窒素雰囲気下で添加し、続いて抽出した。

エンバク、トリチカル、ライ麦、大麦及びテフの粉からのミリスチートで抽出されたタンパク質の還元研究の別々のSDSS-ポリアクリルアミド電気泳動ゲルを調製した。また、テフに関するチオレドキシン関連緩衝液及びエタノールで抽出されたタンパク質の程度を示すゲルを調製した。エンバク、トリチカル、ライ麦、大麦、テフ／ミリスチート抽出研究の全てにおいて、粉を最初に緩衝液、50mMのトリス-HCl、pH7.5で20分間抽出し、次いで70%エタノールで2時間抽出した。その他に、トウモロコシ、モロコシ及び米からのミリスチートで抽出されたタンパク質についてゲルを調製した。トウモロコシ、モロコシ及び米では、粉碎した種子をミリスチートのみで抽出した。それ故、トウモロコシ、モロコシ及び米では、ミリスチート抽出物は全タンパク質に相当し、一方、エンバク、トリチカル、ライ麦、大麦及びテフでは、ミリスチート抽出物はグルテニン均等物フラクションのみ相当する。何となれば、これらの粉は既に緩衝液及びエタノールで抽

出されていたからである。ゲル中で示された結果は、NTS がエンパク、トリチカル、ライ麦、大麦及びテフからのミリステートで抽出された（グルテニン均等物）タンパク質では、GSH またはGSH/GR/NADPHと較べて最も有効であることを示す。また、NTSは米からの全タンパク質で最も有効である。還元されたグルタチオンは

トウモロコシ及びモロコシからの全タンパク質で更に有効である。

#### トウモロコシ、モロコシ及び米からの結論

ミリステートで抽出されたタンパク質の還元状態に関するNTS vsグルタチオン還元酵素の効果に関する第一ゲルにおいて、処理(1)では、mBBBrの存在下のミリステートによる抽出を窒素雰囲気下で行い、処理(2)では、タンパク質の先の還元を行わないで、ミリステートで抽出されたタンパク質にmBBBrを添加し、処理(3)では、ミリステートで抽出されたタンパク質をNADP/チオレドキシン系(NTS)により還元し、処理(4)では、ミリステートで抽出されたタンパク質をNADPH、グルタチオン及びグルタチオン還元酵素により還元した。ミリステートで抽出されたタンパク質の*in vivo*還元状態及びチオレドキシン関連*in vitro*還元に関する第二ゲルにおいて、処理(1)は第一ゲルにおける処理(2)と同様であり、処理(2)では、種子を窒素のもとにmBBBrの存在下でミリステートで抽出し、処理(3)では、種子をミリステートで抽出し、NTSにより還元し、次いでmBBBrを添加し、また処理(4)では、タンパク質をDTTにより還元した以外は(3)のような条件であった。第一ゲルにおける処理(1)及び第二ゲルにおける処理(2)は穀物中のタンパク質の初期の酸化還元状態を示した。3種の穀物の全てについて、種子中のタンパク質は高度に還元された。空気中で抽出した場合、タンパク質、特にモロコシ及び米は酸化されるようになった。酸化されたタンパク質は、全ての場合にNTSで最大に再度還元し得る。米では、還元はチオレドキシンに対し比較的特異性であり、トウモロコシでは、グルタチオンがチオレドキシンと同じ位に有効であり、またモロコシでは、グルタチオンがチオレドキシンよりわずかに有効である。ジチオスレイトールは還元剤として種々の有効性を示した。これらの実験は、これらの穀物の貯蔵タンパク質が小麦の場合よりも特異性ではないことを実証し、かつド



ウ網状構造をつくろうと試みる時に、チオレドキシンがグルタチオンの存在下及び不在下の両方で試験されるべきであることを示唆する。

また、酵母NADP/チオレドキシン系による小麦グルテニン及びグリアジンの夫々の還元研究から得られるゲルを調製した。粉10g 毎に0.1Mの酢酸50mlを使用し、2時間抽出することによりグルテニンを得た。粉10g 毎に70%エタノール50mlを

使用し、2時間抽出することによりグリアジンを得た。ゲルは、その酵母系が小麦貯蔵タンパク質の二つの主要グループを還元するのに高度に活性であることを示した。

また、トチチカル、ライ麦、エンバク及び大麦の夫々の粉からのエタノールで抽出されたタンパク質の還元のためのゲルを調製した。結果は、NTS がトチチカル、ライ麦及びエンバクからエタノールで抽出されたタンパク質で最も有効であることを示した。エタノールで抽出された大麦タンパク質を対照において還元し、チオレドキシンまたはグルタチオンは殆ど効果を有していなかった。

#### 実施例19

クニツ (KUNITZ) 及びボウマン-バーク (Bowman-Birk) 大豆トリプシンインヒビタータンパク質の活性及び安定性に関するチオレドキシン関連還元の効果

#### 物質及び方法

##### 植物物質

デュラム (Durum) 小麦 (*Triticum durum*, Desf. cv. Monroe) は K. Kahn 博士の贈答品であった。小麦胚芽をシグマ・ケミカル社 (セントルイス、MO) から入手した。

##### 薬品及び酵素

ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 用の試薬をバイオラー・ラボラトリーズ (リッチモンド、CA) から入手し、DTT をベーリンガー・マンハイム・バイオケミカルズ (インディアナポリス、IN) から入手した。L-1-トシルアミド-2-フェニルエチルクロロメチルケトン (TPCK) 処理トリプシン (型 XIII、T8640)、サブチリシン (型 VIII: バクテリアサブチリシン

カーブスベルグ、P5380)、KTI (T9003)、BBTI(T9777)、アゾカゼイン、及びその他の薬品をシグマ・ケミカル社(セントルイス、MO)から購入した。E.coliチオレドキシン及びNTRを夫々のタンパク質を過剰発現するように形質転換された細胞から単離した。組換えプラスミド、pFPIを含むチオレドキシン株はJ.-P.

Jacquot (de La Motte-Gueryら, 1991)により親切に提供された。組換えプラスミド、pPMR21を含むNTR株はMarjorie Russel博士及びPeter Model博士(Russel J及びModel, 1988)により親切に提供された。これらのタンパク質に使用した単離操作は下記の変化を伴ってこれらの研究に記載されたとおりであった。細胞をリビ(Ribi)細胞フラクショネーター中で25,000 psiで分解し、またレッドアガロース工程を用いなくてFlorencioら(1988)により記載されたようにしてNTRを精製した。E.coliチオレドキシン及びNTRはSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により測定して夫々100%及び90%の純度であった。小麦チオレドキシンhを既に記載されたようにして精製した(Johnsonら, 1987)。

#### 小麦種子の発芽

小麦種子を50% (v/v)のゼネリック・ブリーチ(Generic Bleach)中で室温で1時間にわたって浸すことにより滅菌し、続いて蒸留水で十分に洗浄した。滅菌した種子をプラスチックベトリ皿中で100  $\mu$ g/mlのクロラムフェニコールを含む蒸留水で湿らした2層のワットマン濾紙の上に置いた。発芽を5日までにわたって暗いチャンバー中で室温で続けた。

#### 小麦プロテアーゼの調製

根及び茎を切除することにより5日発芽した小麦種子から単離した胚乳(10-15gの新鮮なものの重量)を4℃で30分間にわたって10mMの $\beta$ -メルカプトエタノールを含む200 mMの酢酸ナトリウム、pH4.6の5倍容積で抽出した。ホモジネーターを4℃で48,000gで20分間遠心分離した。ペレットを捨て、上澄み液を30-70%硫酸アンモニウムで分別した。このフラクション(これはプロテアーゼ製剤に相当する)を10mMの $\beta$ -メルカプトエタノールを含む200 mMの酢酸ナトリウム、pH4.6の最小容積中で再度懸濁させ、4℃で一夜にわたってこの緩衝液に対し透析した。基質としてのアゾカゼインで分析した時、プロテアーゼ製剤は約4.6の

最適pHを有し、かつ4℃で少なくとも1週間安定であった。

#### トリプシンインヒビターの還元及びタンパク質分解感受性

特にことわらない限り、トリプシンインヒビター(0.4 mg/ml)の還元を、10mMのEDTAを含む20mMのリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.9 0.1 ml中で30℃で2時間にわたって行った。チオレドキシン、NTR、及びNADPHの濃度は夫々0.024 mg/ml、0.02 mg/ml、及び0.25mMであった。還元剤としてDDTを用いると、EDTA及びNADP/チオレドキシン系の成分を省いた。還元後に、インヒビター混合物のアリコートでトリプシン抑制活性またはタンパク質分解感受性の測定のために抜き取った。サブチリシン試験において、インヒビター混合物(50  $\mu$ l)をサブチリシンと直接混合し、室温で1時間インキュベートした。小麦プロテアーゼ製剤では、インヒビター混合物(50  $\mu$ l)のpHを最初に200 mMの酢酸ナトリウム、pH4.6 35  $\mu$ lと混合することにより4.7に調節した。次いで小麦プロテアーゼ製剤10  $\mu$ lを添加し、インキュベーションを37℃で2時間続けた。サブチリシンによる消化を停止するために、100 mMのフェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF) 2  $\mu$ l及び10% SDS 10  $\mu$ lを消化混合物に添加した。植物プロテアーゼ製剤では、等容積のSDSサンプル緩衝液[0.125Mのトリス-HCl、pH6.8、4%(w/v)SDS、20%(v/v)グリセロール、10%(v/v) $\beta$ -メルカプトエタノール、及び0.02%(w/v)プロモフェノールブルー]を添加することにより、消化を停止した。タンパク質分解産物を12%または16% SDS ポリアクリルアミドスラブゲル(Laemmli, 1970)による電気泳動により分析した。乾燥したスラブゲルをレーザーデンスitometer(ファーマシア-LKBウルトラスキャンXL)でスキャンし、KTIまたはBBTIタンパク質バンドのピーク面積をファーマシア・ゲルスキャンXLソフトウェアプログラムによる積分により得た。

#### アッセイ

チオレドキシン及びNTRをFlorencioら(1988)により既に記載されたようにして分析した。トリプシン活性を50mMのトリス-HCl、pH7.9中で、基質としてのN-ベンゾイル-L-アルギニンエチルエステルによる253 nmにおける吸光度の増加(Mundyら, 1984)を追跡することにより、またはアゾカゼイン基質からトリク

ロロ酢酸(TCA)可溶性フラクションへのアゾ色素の放出(以下を参照のこと)に

より測定した。トリプシン抑制アッセイについて、トリプシン( $5 \sim 10 \mu\text{g}$ )を適当な量のKTI またはBBTIとともに室温で5分間にわたって50mMのトリス-HCl、pH 7.9 中でプレインキュベートし、次いでタンパク質分解活性を測定した。2種の基質は同様のデータを生じたが、結果が一種の基質のみで表される。

小麦プロテアーゼ活性をpH4.7 でアゾカゼイン基質からTCA 溶液へのアゾ色素の放出を追跡することにより測定した。20mMの酢酸ナトリウム、pH4.6 の溶液中の小麦プロテアーゼ $50 \mu\text{l}$ 、及び10mMの $\beta$ -メルカプトエタノールを $50 \mu\text{l}$ の200mMの酢酸ナトリウム、pH4.6、及び $100 \mu\text{l}$ の2%アゾカゼイン(20mMのリン酸ナトリウム、pH7.0 中)に添加した。37℃で1時間のインキュベーション後に、1 mlの10% TCA を添加し、その混合物を室温で10分間放置した。マイクロ遠心分離機(8000 g)中で5分間の遠心分離後に、上澄み液1 mlを採取し、1NのNaOH 1 mlと混合した。吸光度を440 nmで読み取った。標準物質としてウシ血清アルブミンを使用して、タンパク質濃度をバイオラーダ試薬で測定した(Bradford, 1976)。

## 結果

### トリプシン抑制活性

大豆の20 kDaクニツ及び8 kDa ボウマン-バークトリプシンインヒビターは夫々2個及び7個のジスルフィド基を含む(Birk, 1976; Wilson, 1988)。それらの生理機能は証明されていなかったが、二つの型のインヒビターはマメ科植物種子中のそれらの広い分布及び栄養障害、例えば、脾臓の肥大及び関連機能不全を生じるそれらの潜在性のために徹底的に研究されていた。表1及び2に示され、また先の実施例に記載されたように、KTI 及びBBTIはE.coliまたは植物からのNADP / チオレドキシン系により特異的に還元される。グルタチオン及びグルタレドキシン(或る種の動物系及びバクテリア系中でチオレドキシンを置換することができ、植物中で生じることが知られていないチオールタンパク質(Holmgren, 1985))の還元形態は効果を有していなかった。

チオレドキシンによる還元の結果を測定するために、KTI 及びBBTIの酸化形態及び還元形態のトリプシン抑制活性を比較した。表11に示されるように、30℃で

2時間のNADP/ チオレドキシン系(NTS)と一緒にブレインキュベーションはトリ

プシン抑制活性のかかりの損失をもたらした(即ち、未抑制対照に対しトリプシン活性の増大があった)。更に詳しくは、NADP/ チオレドキシン系は夫々KTI 及びBBTIについてトリプシン活性の3倍の増加及び6倍の増加を生じた。同様の結果が、チオレドキシンの非生理学的代替物であるDTT 及び天然産ジチオールであるリボ酸により還元されたチオレドキシンで得られた。DTT 単独と一緒に延長されたインキュベーション(室温で一夜)は両方のインヒビターの完全失活またはほぼ完全な失活をもたらした(データは示されていない)。DTT と違って、リボ酸はチオレドキシンの不在下でKTI 及びBBTIを有意に還元(失活)しなかった。

表11

NADP/ チオレドキシン系、DTT または還元されたりボ酸による還元後のトリプシンを抑制する大豆トリプシンインヒビターの能力の変化

処理	相対的トリプシン活性*	
	KTI	BBTI
インヒビターなし	100	
インヒビター		
酸化されたもの	17.0	
NTS <sup>1</sup> により還元されたもの	55.6	
DTT <sup>2</sup> により還元されたもの	68.6	
LA/Trx h <sup>3</sup> により還元されたもの	40.5	

試験したラット中の粉の消化性及び栄養価(Friedman 及びGumbman, 1986)。これらの先の観察と一緒にすると、本知見はチオレドキシンにより標的とされたKTI 及びBBTIの両方のジスルフィド結合がトリプシン抑制活性の維持に重要であることを実証する。

#### 熱安定性

プロテアーゼインヒビタータンパク質は典型的には熱の如き失活処理に安定で

ある。この安定性はジスルフィド結合の架橋に少なくとも一部起因している (Birk, 1976; Ryan, 1981)。還元によりジスルフィド結合を分解すると、熱安定性を低下することが知られている (Friedman ら, 1982)。チオレドキシンによる還元が同様の結果を生じるのかについて質問が生じる。

表12に示された結果はこの質問に積極的な回答を与える。80℃で15分間加熱された時、KTI のチオレドキシンで還元された形態はトリプシンを抑制するその能力を完全に失ったが、その酸化された相対物は最初の活性のほぼ半分を保持した (表12)。酸化されたBBTIは更に安定であり、100℃で25分間加熱した後にそのトリプシン抑制活性の正味を保持した。それにもかかわらず、KTI と同様に、BBTIの還元形態は熱により完全に失活された (表12)。これらの結果は、(i)KTI及びBBTIが還元後に熱に対し増大された感受性を示し、かつ(ii)溶液中の純粋なBBTIが溶液中の純粋なKTI よりも熱安定性であるという先の観察と一致する。その逆が粉について真である (即ち、KTI はBBTIよりも熱安定性である (Friedman ら, 1982及び1991; 並びにDiPietro及びLiener, 1989))。

表12

酸化され、またE. coli NADP/チオレドキシン系による還元後のクニツ及びボウマ  
スーパークトリプシンインヒビターの熱安定性

処理	相対的トリプシン活性*	
	KTI	BBTI
インヒビターなし	100	100
加熱されなかったインヒビター		
酸化されたもの	26.6	9.4
還元されたもの	76.4	82.4
80℃で15分間加熱されたインヒビター		
酸化されたもの	52.3	nd <sup>1</sup>
還元されたもの	98.7	nd
100℃で25分間加熱されたインヒビター		
酸化されたもの	nd	17.2
還元されたもの	nd	98.4

\* 基質としてアゾカゼインを使用して、トリプシンの比活性は $0.319 \Delta A_{440\text{ nm}}/\text{mg/分}$ であった。失活に使用した温度を、本発明者らの条件のもとにトリプシンインヒビターの熱安定性を示すように設計した初期実験で測定した。

nd:測定せず

#### プロテアーゼ感受性

KTI 及びBBTIの還元形態がトリプシン以外のプロテアーゼに対し低下された安定性を示すか否かを試験するために、KTI 及びBBTIの還元形態及び酸化形態の両方を小麦プロテアーゼ製剤またはサブチリシンとともにインキュベートし、タンパク質分解産物をSDS-PAGEにより分析した。タンパク質分解の程度を、レーザーデンストメーターによりSDS ゲルについて無傷タンパク質の多さを測定することにより測定した。5日発芽した小麦種子からのプロテアーゼ製剤で試験した時、クニツインヒビターの酸化形態は消化に対しほぼ完全に耐性であったが、一方、チオレドキシンで還元された形態はプロテアーゼに感受性であった。表13に示されるように、KTI の約80%がNADP/チオレドキシン系(NTS)の全ての成分に依存する反応で分解した。BBTIは、酸化されたタンパク質がKTI に対し大きいタンパク質分解感受性を示した以外は同じパターンを示した。植物プロテアーゼ製剤をサブチリシンにより置換した時に、同様の効果が両方のインヒビターで観察された(データは示されていない)。タンパク質分解反応の性質を研究しなかったが、ペプチド生成物がSDS ゲルについて検出されなかったことが注目される。

表13

植物プロテアーゼ製剤<sup>1</sup> によるタンパク質分解に対するクニツトリブシンインヒビター及びボウマンバークトリブシンインヒビターの感受性に関するチオレドキシン関連還元の効果

処理	相対的多さ <sup>2</sup>	
	KTI	BBTI
プロテアーゼなし	100	100
プロテアーゼ		
還元系なし	97.9	67.2
E. coli NTS <sup>3</sup>	22.1	16.0
NTS マイナスチオレドキシン	90.2	nd <sup>4</sup>
NTS マイナスNADPH	97.7	nd
NTS マイナスNTR	97.9	nd

<sup>1</sup>30℃で2時間のE. coliチオレドキシン系による還元後に、pHを200 mMの酢酸ナトリウム、pH4.6の添加により4.7に調節した。次いで小麦プロテアーゼ製剤を添加し、37℃で2時間インキュベートし、続いてSDS-PAGE分析を行った。

<sup>2</sup> レーザーデンストメーターにより測定した。

<sup>3</sup>NTS: NADP/チオレドキシン系

<sup>4</sup>nd:測定せず

この実施例は、チオレドキシン、またはジチオスレイトール(DTT)による還元が両方のタンパク質の失活並びにそれらの熱感受性及びプロテアーゼ感受性の増大をもたらすことを示す。結果は、インヒビタータンパク質のチオレドキシン関連還元がそれらの工業上の加工及び種子発芽の両方に妥当であることを示す。

これらの結果は、ジスルフィド結合がKTI及びBBTIのトリブシン抑制活性に必須であるという結論(Birk, 1985; Friedman及びGumbmann, 1986; Friedmanら, 1982, 1984)を確かめる。また、これらの研究は、還元(失活)が生理条件(即ち、NADPHで還元されたチオレドキシンでは低温で)起こり得ることを示す。低

温でトリブシンインヒビターを失活する能力は両方のトリブシンインヒビターの



充分な失活について可能な方法を与え、それにより大豆製品の品質を改良し、エネルギーを節約する。KTI の完全失活の方法に対する要望は重要である。何となれば、その活性の20%は、BBTIが十分に失活される条件下で大豆粉中で一貫して保持されるからである(Friedman ら, 1991)。

また、これらの結果はKTI 及びBBTIのプロテアーゼ感受性について新しい情報を加える。還元後のプロテアーゼ感受性のそれらの増大は、種子発芽中にプロテアーゼインヒビターに暴露された場合、NADP/ チオレドキシン系は、インヒビタータンパク質が変性(失活)され、最終的に分解されるメカニズムとして利用し得ることを示唆する(Baumgartner及びChrispeels, 1976; Chrispeels及びBaumgartner, 1978; Orf ら, 1977; Wilson, 1988; Yoshikawa ら, 1979)。既に述べたように、NADP- チオレドキシン系は小麦種子の発芽中にタンパク質を可動化するのに同様の役割を果たすという証拠がある。

#### 実施例20

##### チオレドキシンによるヒマ種子 2 S アルブミンタンパク質の還元

ヒマ種子(Sharief & Li, 1982; Youle & Huang, 1978)からの 2 S タンパク質を還元するスルフヒドリル試薬の下記実験の結果から、チオレドキシンが 2 S 大サブユニットの分子内ジスルフィドを活発に還元するが 2 つのサブユニットを結合する分子間ジスルフィドを還元しないことがわかる。

#### 材料及び方法

##### 材料

ヒマ(*Ricinus communis* L. var Hale)の種子を Bothwell Enterprises(テキサス州プレーンビュー)から入手した。生化学薬品を Sigma Chemical Co.(ミズーリ州セントルイス)から入手した。大腸菌チオレドキシン及びNTRを、各タンパク質を過剰発現するために形質転換した細胞から単離した。組換えプラスミド pFP I を含むチオレドキシン株は、Dr. J.-P. Jacquotから恵与された(de La Mott-Gueryら, 1991)。組換えプラスミド、pPMR 21 を含む菌株は、Dr. Marjorie Russel と Dr. Peter Model から恵与された(Russel & Model, 1988)。

チオレドキシン及びNTRをde La Mott-Gueryら(1991)及び Florencioら(1988)

の各手順で精製した。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動の試薬を Bio-Rad Laboratories (カリフォルニア州リッチモンド) から購入した。モノブロモビマン (mBBr) 又はチオライトを Calbiochem (カリフォルニア州サンディエゴ) から入手した。他の薬品を販売元から入手し、入手可能な最高品質とした。NADP-リンゴ酸デヒドロゲナーゼ及びフルクトース-1,6-ビスホスファターゼをコーン (Jacquotら, 1981) 及びホウレンソウ (Nishizawaら, 1982) の葉から精製した。チオレドキシン h を、ホウレンソウタンパク質のために考え出された手順を行うことにより小麦種子から単離した (Florencioら, 1988)。グルタチオンレダクターゼをホウレンソウの葉から調製した (Florencioら, 1988)。

#### プロテインボディーの単離

プロテインボディーを非水溶液法で単離した (Yatsu & Jacks, 1968)。莢から出した乾燥ヒマ種子、15 g を 40 ml のグリセロールとワーリングブレンダーで 30 秒間混合した。混合液を 4 層のナイロクロスでろ過した。粗抽出液を JS-20 ローターを用いるベックマン J、2-21 M 遠心機で  $272 \times g$  で 5 分間遠心分離した。遠心後、上清画分を集め、 $41,400 \times g$  で 20 分遠心分離した。プロテインボディーを含む沈降物を 10 ml のグリセロールに再懸濁し、前のように ( $41,400 \times g$  で 20 分間) 遠心分離し、沈降物を集めた。この洗浄工程を 2 回繰り返した。沈降物を 3 ml の 100 mM トリス-HCl バッファー (pH 8.5) で抽出することにより可溶性 (“マトリックス”) 画分が得られた。前のように遠心分離して集めた残りの不溶性 (“クリスタロイド”) 画分を 100 mM トリス-HCl バッファー (pH 8.5) 中 3 ml の 6 M 尿素で抽出した。

#### 2S タンパク質精製手順

2S タンパク質を Tully & Beevers (1976) の方法を変更して調製した。マトリックスタンパク質画分を 5 mM トリス-HCl バッファー、pH 8.5 (バッファー A) で平衡化した DEAE セルロース (DE-52) カラムに加え、バッファー A 中 0 ~ 300 mM NaCl 勾配で溶離した。2S を含む画分をプールし、凍結乾燥により濃縮した。濃縮した画分を 150 mM NaCl を含有するバッファー A で平衡化したファーマシア FPLC スパーロース-12 (HR10/30) カラム

に加えた。スーパーローサー12カラムからの2Sタンパク質を含む画分をバッファAで平衡化したFPLC Mono Q HR 5/5カラムに加えた。カラムを3mlのバッファA、バッファA中20mlの0~300mM NaClの直線勾配、最後に1M NaClを含有するバッファAで連続して溶離した。この方法で精製した2Sタンパク質は、クーマシーブルーで染色したSDSポリアクリルアミドゲル中不純物を含まなかった (Kobrehelら, 1991)。

#### 分析法

タンパク質の還元を、Crawfordら(1989)のモノブロモビマン(mBB r)/SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法によりモニターした。標識タンパク質を“穀物タンパク質の還元、材料及び方法”で前述したように定量した。タンパク質をブラドフォード法によって求めた(1976)。

#### 酵素分析/還元実験

チオレドキシン及び2Sタンパク質の存在下にNADP-リンゴ酸デヒドロゲナーゼ及びフルクトース1,6-ビスホスファターゼを分析するためにWadaら, 1981プロトコルを用いた。チオレドキシン添加量がヒマ2Sタンパク質を還元するのに十分であるが標的酵素を認めうるほど活性化するには不十分である条件下に分析を行った。分析中は25℃とした。特にことわらない限り、使用したチオレドキシン及びNTRは、大腸菌由来とした。ジチオトレイトール及び大腸菌チオレドキシンによる還元後のmBB r/SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動による精製中に2Sタンパク質をモニターした (Crawfordら, 1989; Kobrehelら, 1991)。

ヒマ種子からのマトリックスとクリスタロイドのタンパク質の還元をmBB r/SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動手順で求めた。ゲルのレーン(図示されていない)は次の通りとした。1及び7、対照: 添加なし; 2及び8、GSH/GR/NADPH: 還元グルタチオン、グルタチオンレダクターゼ(ハウレンソウの葉由来)及びNADPH; 3及び9、NGS: NADPH、還元グルタチオン、グルタチオンレダクターゼ(ハウレンソウの葉由来)及び大腸菌由来グルタレドキシン; 4及び10、NTS: NADPH、NTR及びチオレドキシン(共に大腸菌由来のタンパク質); 5及び11、NADPH; 6及び12、NAD

PH及び大腸菌NTR。100 mM トリス-HCl バッファー、pH 7.8 中で反応を行った。指示されたように、0.7  $\mu$ g のNTR及び1  $\mu$ g のチオレドキシンを1 mM NADPH 及び標的タンパク質：処理1-6については8  $\mu$ g マトリックスタンパク質及び処理7-12については10  $\mu$ g クリスタロイドタンパク質を含有する7.0  $\mu$ l のそのバッファーに加えた。グルタチオンを用いる分析は、最終濃度2 mM、1.4  $\mu$ g のグルタチオンレダクターゼ、1  $\mu$ g のグルタレドキシン及び1.5 mM NADPH 以外は同様に行った。反応時間は、20分とした。

ヒマ種子2Sタンパク質のジスルフィド結合を還元するチオレドキシンの特異性を求めるためにmBBR/SDS-Page法を用いた。ゲルのレーン（図示されていない）は次の通りとした。（1）対照（添加なし）；（2）対照+NTS（マトリックスとクリスタロイドのタンパク質と同じ条件）；（3）対照（100℃で3分加熱した）；（4）対照+2 mM DTT（100℃で3分加熱した）。5  $\mu$ g の2Sタンパク質及び指示された添加剤を含有する試料を30 mM トリス-HCl（pH 7.8）中で20分間インキュベートした。次に、mBBR、80 mMを加え、反応を更に15分間続けた後、mBBR/SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動手順で分析した。

### 結果

種子成熟中にプロテインボディー内に保持されるヒマ貯蔵タンパク質を溶解度に基づいて2つの画分に分けることができる。可溶性の大きいタンパク質はプロテインボディーの外側部分（“マトリックス”）に貯蔵され、可溶性の小さいタンパク質は内側部分（“クリスタロイド”）に貯蔵される。本実験では、マトリックスとクリスタロイドの成分を、細胞チオール、即ち、グルタチオン、グルタレドキシン及びチオレドキシンによる還元能力を求めるために単離した。触媒活性チオール基を有するグルタレドキシン、12 kDaタンパク質は、細菌及び動物のある種の酵素反応でチオレドキシンに置き換わる（Holmgrenら、1985）が植物では起こらないことが既知である。

結果から、ヒマ種子の多数の貯蔵タンパク質が試験したチオールによって還元されたが、マトリックスの2Sタンパク質の大サブユニットに対応する低分子量タンパク質のみがチオレドキシンの厳密な特異性を示したことがわかった。クリ

スタロイド画分のある種の高分子量タンパク質は還元されたが、その場合にはグルタレドキシシンとチオレドキシシン間にほとんど差がなかった。即ち、ヒマ種子2S大サブユニットは、チオレドキシシン特異的還元を行うことが以前に論じられたシスチン含有タンパク質と似ていることがわかってきた。これらの実験は、この特異性を確認するために及び還元タンパク質のある種の性質を明らかにするために設計された。予想したように、ジスルフィド基がないために、2S小サブユニットは試験した還元剤のいずれを用いてもmBB rとの実質的な反応を示さなかった。

蛍光バンドをレーザーデシトメトリーによりモニターした場合、ヒマ種子2S大サブユニットの還元がNADP/チオレドキシシン系(NADPH、NTR及びチオレドキシシン)の全成分に左右されることがわかった(表14)。他のチオレドキシシン結合タンパク質(葉緑体酵素を含む)については、2S大サブユニットの還元に関与するチオレドキシシンは、ジチオトレイトール(DTT)で化学的に或いはNADPG及びNTRで酵素的に還元される。NADPチオレドキシシン系、DTTのみ及びDTT+チオレドキシシンによる還元程度は、25℃で20分後に各々84%、67%及び90%であった。上述したジスルフィドタンパク質においても一般に広範囲であるが同様の還元が認められた(Johnsonら, 1987)。他の種子タンパク質とのように、未変性小麦チオレドキシシンh及び大腸菌チオレドキシシンは、2Sタンパク質のDTTによる還元において同じ意味に用いられる(データは示されていない)。

表14

異種スルフヒドリル還元剤によるヒマのヒマ種子2Sタンパク質の還元程度。マトリックス及びクリスタロイドのタンパク質定量と同じ反応条件。100%は、2Sタンパク質が2%SDS及び2.5%β-メルカプトエタノールの存在下に3分間加熱した場合に得られた還元に対応する。NTS: NADPH、NTR及びチオレドキシシン(共に大腸菌由来のタンパク質); GSH/GR/NADPH: 還元グルタチオン、グルタチオンレダクターゼ(ホウレンソウの葉由来)及びNADPH; NGS: NADPH、還元グルタチオン、グルタチオンレダクターゼ(ホウレンソウの葉由来)及びグルタレドキシシン(大腸菌由来)。

処理	相対還元、%
対照	0
NADP/チオレドキシン系、全部分	84
" - チオレドキシン	0
" - NADPH	0
" - NTR	0
還元グルタチオン	0
NADP/グルタレドキシン系、全部分	0
DTT	67
DTT + チオレドキシン	90

チオレドキシンのヒマ種子 2 S タンパク質を還元する能力は、酵素活性化分析でも明らかであった。ここでは、チオレドキシンが標的にするタンパク質（この場合 2 S）を用いて葉緑体のチオレドキシン結合酵素、NADP-リンゴ酸デヒドロゲナーゼ又はフルクトース 1,6-ビスホスファターゼを活性化する。これまでに調べたタンパク質のほとんどのように、2 S タンパク質は NADP-リンゴ酸デヒドロゲナーゼをより効果的に活性化し、フルクトースビスホスファターゼとはほとんど活性を示さなかった（2.6 に対して 0.0 nM/分/mg タンパク質）。

ヒマ種子 2 S タンパク質は、分子間及び分子内ジスルフィドを含む。従って、2 S タンパク質により、これら 2 種類の結合に対してチオレドキシンの特異性を決定する機会が提供される。これを目的として、ヒマ種子 2 S タンパク質を (i) 室温において NADP/チオレドキシン系で酵素的に及び (ii) 100℃において DTT で化学的に還元した。mBBr と反応させた後、スルフヒドリル剤を添加せずに行った SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で還元したタンパク質を分析した。結果から、チオレドキシンは分子内ジスルフィドを活発に還元したが分子間ジスルフィドについてはほとんど有効でなかったことが示される。

本結果は、ヒマ種子、油生産植物の 2 S タンパク質の還元に対するチオレドキシンの役割を拡張するものである。チオレドキシンは、2 S タンパク質の大サブユニットの分子内ジスルフィドを特異的に還元し、大サブユニットと小サブユニットを結合する分子間ジスルフィドの活性をほとんど示さなかった。ダイズのトリプシンインヒビターとの結果に基づいて、チオレドキシンによる分子内ジスルフィドの還元がジスルフィドタンパク質のタンパク質分解に対する感受性を著し

く高めることは明らかである(Jiaoら, 1992a)。しかしながら、2Sタンパク質

の還元が、小麦の主要な貯蔵タンパク質の場合であると考えられるタンパク質分解の分解前に起こるかをなお知るべきである(Youle & Huang, 1978)。この研究によって生じた関連の課題は、ヒマ及びブラジルナットのような他の油生産植物(Altenbachら, 1987; Ampeら, 1986)の2Sタンパク質が貯蔵タンパク質のほかにも機能があるかについてである。

### 実施例 2 1

#### 特異的インヒビタータンパク質の不活性化による穀物のプルラナーゼのチオレド

#### キシシン依存性脱阻害

#### プルラナーゼの分析

##### 1. マルトトリオースの標準曲線:

0.1 ~ 0.2 mlの水又はバッファー中一連の濃度のマルトトリオース (0 ~ 2 mg) をマイクロフュージ管で行った。これに0.2 mlのジニトロサリチル酸 (DA) 試薬を加えた (1 gのDA、30 gの酒石酸カリウムナトリウム及び20 mlの2N NaOHを水と最終容量100 mlに混合する)。試薬を温水浴中で溶解した。混合液を100℃で5分間加熱し、水浴中で冷却した (室温)。各試料を2 mlの水を含むガラス管に移した。水に対する $A_{493}$ を読み取った。 $\Delta A_{493}$  [マルトトリオースを含む試料の $A_{493}$ をブランク (マルトトリオースなし) の $A_{493}$ から引いた] をマルトトリオース濃度に対してプロットした。

##### 2. プルラナーゼ活性の分析

プルラナーゼ活性を、基質プルランから還元糖の遊離として測定する。典型的には、10 ~ 100  $\mu$ lのプルラナーゼ試料 (トリス-HCl、pH 7.5又は5 ~ 20 酢酸塩-NA、pH 4.6中) を25 ~ 100  $\mu$ lの200 mM酢酸塩-NA、pH 5.5 (このバッファーは分析物の最終pHを5.5にするのに役立つ) 及び10 ~ 20  $\mu$ lの2% (w/v) プルランと混合した。混合液を、プルラナーゼの活性に基づいて37℃で30 ~ 120分間インキュベートした。200  $\mu$ lのDA試薬を加えて反応を停止させた。次に、還元糖を上記のように求めた。

注:

1. 粗抽出液の透析によって得られたプルラナーゼの粗抽出液又は透析した30～60%硫酸アンモニウム画分から得られたプルラナーゼをプルラナーゼ源

として用いる場合、粗抽出液中に還元糖があることから分析前に十分に透析しなければならない。言い換えると、透析した粗抽出液又は透析した30～60%硫酸アンモニウム画分からの粗プルラナーゼ試料のバックグラウンドは非常に高い。この場合、ブランクは次の通り行われる。まず、 $200\mu\text{l}$ のDA試薬を加え、次に、酵素試料、プルラン及びバッファーを加える。

2. 最終濃度のDTT (又は $\beta$ -メルカプトエタノール (MET) 又はGSH) が分析混合液中 $2\text{mM}$ より大きい場合、 $\text{OD}_{493}$ 値はDTT (MET、GSH) なしの試料より大きい。ブランク、DTTのない試料に反応の終わりの分析でDTT (MET、GSH) を添加しなければならない。分析混合液中最終濃度のDTTが $2\text{mM}$ よりも小さいことを確実にするために注意しなければならない。

#### プルラナーゼインヒビター抽出の精製及び硫酸分画

$200\text{g}$ の大麦芽を電気コーヒングライNDERで微粉末に粉碎し、5% (w/v) NaClで $30^\circ\text{C}$ において3時間抽出した。 $30,000\text{g}$ 、 $4^\circ\text{C}$ で25分間遠心分離した後、上清を固体硫酸アンモニウムで沈殿させることにより分別した。

30～60%飽和硫酸アンモニウムで沈殿したタンパク質を最小量の $20\text{mM}$ トリスHCl、 $\text{pH}7.5$ に溶解し、このバッファーに対して $4^\circ\text{C}$ で一晩透析した。

#### DE52クロマトグラフィー

透析した試料を遠心して不溶性物質を除去し、上清を $2\text{N}$ ギ酸で $\text{pH}4.6$ に調整した。酸変性タンパク質を沈降させた後、上清を $\text{NH}_4\text{OH}$ で $\text{pH}7.5$ に再調整し、 $20\text{mM}$ トリス-HCl、 $\text{pH}7.5$ で平衡化したDE52カラム ( $2.5 \times 26\text{cm}$ ) に装填した。 $80\text{ml}$ の上記バッファーで洗浄した後、カラムを直線 $0 \sim 500\text{mM}$ トリス-HCl、 $\text{pH}7.5$ で溶離した。 $6.7\text{ml}$ の画分を集めた。プルラナーゼを約 $325\text{mM}$ NaClで溶離し、そのインヒビターは約 $100\text{mM}$ NaClで離れた。プルラナーゼを、CM32 ( $20\text{mM}$ 酢酸ナトリウム、 $\text{pH}4.6$ ) 及びセファクリル-200HR ( $200\text{mM}$ NaCl及び $1\text{mM}$ EDTAを含有する $30\text{mM}$ トリス-HCl、 $\text{pH}7.5$ ) クロマトグラフィーで更に精製した。プ



プルラナーゼインヒビタータンパク質を下記のように精製した。

#### CM32クロマトグラフィー

DE52工程からのプルラナーゼインヒビター試料(約90ml)を150mlガラスコに入れ、70℃の水浴で20分間インキュベートした。遠心分離した後、清澄化試料を2Nギ酸でpH4.6に調整し、20mM酢酸ナトリウム、pH4.6に対して透析した。透析で生じた沈殿を遠心分離で除去し、上清を20mM酢酸ナトリウム、pH4.6で平衡化したCM32カラム(2.5×6cm)でクロマトグラフィー処理した。タンパク質を、200mlの20mM酢酸ナトリウム、pH4.6中直線0~0.4M NaClで溶離した。プルラナーゼ阻害活性を含む画分(5.0ml/画分)をプールし、透析し、200mlの20mM酢酸ナトリウム、pH4.0中0.2~1M NaCl直線勾配を用いてCM32カラム(2.5×6cm)により再クロマトグラフィー処理した。

#### セファデックスG-75ろ過

第2CM32クロマトグラフィー工程からのプルラナーゼインヒビター画分を固体スクロースに対して透析バッグで濃縮し、次に、200mM NaCl及び1mM EDTAを含有する30mM トリス-HCl、pH7.5で平衡化したセファデックスG-75カラム(2.5×85cm)で分離した。プルラナーゼ阻害活性を示す画分(3.6ml/画分)をプールし、固体スクロースに対する透析で濃縮し、次に、10mM トリス-HCl、pH7.5に対して透析した。

#### プルラナーゼインヒビターの同定及び精製

発芽中に、デンプンが $\alpha$ -、 $\beta$ -アミラーゼ及びプルラナーゼ(枝切り酵素、R酵素とも呼ばれる)によりグルコースに変わる。アミラーゼの制御に対して多くの研究が行われたが、種子におけるプルラナーゼの制御についてはほとんど不明である。Yamada(Yamada, J.(1981)Carbohydrate Research 90:153-157)は、穀物粉を還元剤(例えば、DTT)又はプロテアーゼ(例えば、トリプシン)とインキュベートするとプルラナーゼ活性の活性化をもたらし、還元又はタンパク質分解がプルラナーゼを発芽中に活性化する機構であることを示すことを報告した。米粉でのように、発芽した小麦種子又は大麦麦芽からのプルラナーゼ抽出液は

、低活性を示し、D T Tと20～30分間ブレインキュベートすることにより3～5倍に活性化した。しかしながら、粗抽出液(30～60%硫酸分画の透析物)をアニオン又はカチオン交換クロマトグラフィーで精製した後、全ブルラナーゼ活性はD T Tとブレインキュベーションせずに分析した場合にカラムに加え

た試料より2～3倍増大し、D T Tはブルラナーゼに全く或いはほとんど影響しない。1つの可能性は、発芽した小麦種子又は大麦麦芽が高プロテアーゼ活性を示すので、ブルラナーゼが精製工程中にタンパク質分解により活性化されることであった。これが事実であるならば、プロテアーゼインヒビター反応混液を添加すると精製中のブルラナーゼ活性化が防止される。この点と対照的に、プロテアーゼインヒビターを用いた多くの実験はこれを証明することができなかった。他の可能性は、硫酸アンモニウムによって沈殿しかつブルラナーゼを阻害するインヒビターがあることであった。D T Tの役割は、このタンパク質インヒビターを還元し不活性化することであり、ブルラナーゼの活性をもたらす。これに沿って、大麦麦芽からの30～60%硫酸分画を20 mM トリス-HCl、pH 7.5で平衡化したDE 52カラム(2.5×26 cm)に加えた。直線塩勾配で溶離した後、“脱阻害した”(“活性化した”)ブルラナーゼを約325 mM NaClで離れるタンパク質ピークとして同定した(分画 No. 44～60)。50  $\mu$ lのピークブルラナーゼ活性画分(分画 No. 45)と50  $\mu$ lの他のタンパク質画分からなるブレインキュベーション混合液中のブルラナーゼ活性の分析により、ブルラナーゼ阻害活性を示すタンパク質ピークを約100 mM NaClによるDE 52カラムから分画 No. 8～25で溶離することが示された。

ブルラナーゼインヒビター試料を、更に、pH 4.6及び4.0のCM 32を用いる2段階の逐次カチオン交換クロマトグラフィー及びセファデックスG-75を用いるる過で精製した。

#### ブルラナーゼインヒビターの特性

予備的実験から、ブルラナーゼインヒビタータンパク質が70℃10分間及びpH 4.0の処理に対して耐性であることがわかった。セファデックスG-75ゲルろ過及びSDS-PAGEのプロファイルに基づき、ブルラナーゼインヒビ

ターの分子量は8～15 kDa ± 2 kDaである。実験から、更に、タンパク質がチオレドキシン還元可能な(S-S)結合を含むことがわかった。

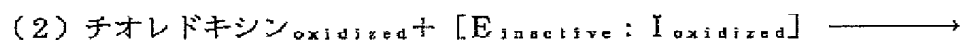
表15に示されるように、これらの実験から、偏在性ジチオールタンパク質、チオレドキシンが大麦及び小麦の内乳のプルラナーゼを阻害する以前には不明であったジスルフィド含有タンパク質に特異的な還元剤として働くことがわかった。

表15

NADP/チオレドキシン系による還元後のプルラナーゼインヒビタータンパク質の活性変化

処理	相対 プルラナーゼ 活性
インヒビターなし	100
インヒビター	
酸化	30.1
DTTによる還元	46.1
大腸菌Trx/DTTによる還元	95.1
大腸菌NTSによる還元	40.4
GSH/NADPH/GRによる還元	33.6

インヒビタータンパク質を還元すると、プルラナーゼ阻害能を除去し、プルラナーゼ酵素を活性にした。表15に示されるこれらの実験は、NADPH、NADP-チオレドキシンレダクターゼ(NTR)及びチオレドキシン(NADP/チオレドキシン系)からなる生理系及びチオレドキシン(Trx)及びジチオトレイトールによりプルラナーゼ酵素を活性にすることが可能であることを示している。これらの知見は、また、プルラナーゼの還元的活性化がどのように起こるかを解明する(即ち、特異的(以前には不明であった)インヒビターを還元して不活性化するので酵素が活性になる)。この反応において活性なチオレドキシンは、大腸菌又は種子内乳(チオレドキシンh)のような数種の供給源から得られる。インヒビタータンパク質(I)を還元的に不活性化しかつプルラナーゼ酵素(E)を脱阻害するにあたってのチオレドキシンの役割を下記式1及び2に示す。



概説すると、粗内乳抽出液をカラムクロマトグラフィー法で分画した。これらの工程は、タンパク質インヒビターをプルラナーゼ酵素から分離するのに役立った。次に、インヒビタータンパク質を数工程で高度に精製した。mBB r / SDS-PAGE法の使用により、新たなタンパク質のジスルフィド基がチオレドキ

シンで特異的に還元されること及び還元されたタンパク質がプルラナーゼ阻害能を消失することが求められた。種子の他種ジスルフィドタンパク質（例えば、ダイズのクニッツ&ボーマン・パークトリプシンインヒビター）のように、プルラナーゼインヒビタータンパク質は葉緑体NADP-リンゴ酸デヒドロゲナーゼの活性化能力を示した。これらの実験において、ジチオトレイトールはチオレドキシンを還元するために用いられ、インヒビターを還元してデヒドロゲナーゼ酵素を活性化した。

## 実施例 2 2

チオレドキシン及びNADP-チオレドキシンレダクターゼを過剰発現する酵母細胞の操作

2種類のサッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)チオレドキシン遺伝子(Muller, E.G.D.(1991), J. Biol. Chem. 266:9194-9202)、TRX1及びTRX2を、高コピー数のエピソームベクター、例えば、YEp24で強力構成プロモーター因子、例えば、グリセルアルデヒド-3-Pデヒドロゲナーゼ、エノラーゼ又はホスホグリセレートキナーゼ遺伝子の解糖プロモーターの制御下にクローン化する。組換え構築物について、抗チオレドキシンウサギ抗血清(Muller, E.G.D. ら(1989), J. Biol. Chem. 264:4008-4014)を用いて量的ウェスタンブロット法によりチオレドキシンの過剰発現を評価してチオレドキシン遺伝子及びプロモーター因子の最適組合わせを選定する。最適チオレドキシン過剰発

現系を有する細胞をドウ改良用チオレドキシン源として用いる。

NADP-チオレドキシンレダクターゼ遺伝子を、アミノ末端配列から推定したオリゴヌクレオチドプローブを調製することによりクローン化する。ホウレンソウの葉について考え出された手順(Florencio, F.J.ら(1988), Arch. Biochem. Biophys. 266:496-507)を変更して酵母細胞から酵素を調製する。純粋なレダクターゼ酵素のアミノ末端を、アプライドバイオシステム気相タンパク質シーケンサーを用いて自動エドマン分解によるマイクロシーケンシングで決定する。この配列に基づいて及び酵母におけるコドン使用によって、20塩基24文字縮重DNAプローブを調製する。プローブを、サザンブロット分析によりEcoRI及びPstIで切断した単離酵母DNAに対してハイブリッド形成する。最も活

発な領域を、アガロースゲルから抽出し、pUC19プラスミドベクターに導入する(Szekeres, M.ら(1991)J. Bacteriol. 173:1821-1823)。形質転換後、プラスミド含有大腸菌コロニーを標識オリゴヌクレオチドプローブを用いてコロニーハイブリッド形成により選別する(Vogeli, G.ら(1987), Methods Enzymol. 152:407-415)。クローンを、上記Szekeresらに示されたDNAを配列決定することによりNADP-チオレドキシンレダクターゼの遺伝子をもつものとして同定する。同定されると、上記の酵母内でTRX1及びTRX2酵母チオレドキシン遺伝子のNADP-チオレドキシンレダクターゼ遺伝子が過剰発現される。NADP-チオレドキシンレダクターゼを過剰発現する酵母細胞を、ドウの品質を改良するレダクターゼ源として用いる。

### 実施例 23

#### 遺伝子操作した酵母細胞を用いるドウの品質改良

2種類の酵母チオレドキシン及び実施例23に示される酵母NADP-チオレドキシンレダクターゼを過剰発現するように操作したサッカロミセス・セレビスエ細胞を音波処理のような確立された方法により溶菌し、次に、凍結乾燥する。チオレドキシン及びNADP-チオレドキシンレダクターゼを過剰発現する培養物からの乾燥細胞を合わせ、次に、補充粉末に用いてドウの品質を改良する。0

・2 gの合わせた溶菌乾燥細胞を、約300～約500 nMのNADPHと共に1 M トリス-HClバッファー、pH 7.9に加えて5.25 mlの30 mM トリス-HClを得た。実施例14に記載されたように反応はマイクロファリノグラフで行われる。実施例14に示された改良と同様のドウの品質の改良が認められる。

#### 実施例 2.4

##### グルテンの改良

ドウの品質に対するNADP/チオレドキシン系の正の効果は、グルテンの調製においてこの系を小麦粉に加える選択を存在させる。目的は、グルテンの収量及び性質を変えることであり、(1) 強力グルテンを得ること(高弾性、伸長性の改善); (2) タンパク質網目構造においてNADP-チオレドキシン系によって還元された可溶性タンパク質を捕捉することによりグルテン収量を増やし、グルテンの製造中に洗い流されないように防止することにより工学的価値を高める

ことである。本手順(10 gの小麦粉)において、0.2  $\mu$ gの大腸菌チオレドキシン、0.1  $\mu$ gの大腸菌NADP-チオレドキシンレダクターゼ及び300～500 nMのNADPHを1 M トリス-HCl、pH 7.9、バッファーと共に加えて5.25 mlの30 mM トリス-HClを得る。グルテンは、一般の溶剤処理法に従って室温で製造される。グルテンの収量は、重量で求められ、グルテンの強度は古典的な手動の伸長法で求める。NADP/チオレドキシン系による本処理によって得られるグルテン生成物は、小麦粉又は他の穀粒中に添加剤として用いられる。

#### 実施例 2.5

##### 非小麦粉又は非ライ麦粉からのドウの製造方法

本試験(コーン、米又はモロコシから10 gの製粉を用いる)については、0.2  $\mu$ gの大腸菌チオレドキシン、0.1  $\mu$ gの大腸菌NADP-チオレドキシンレダクターゼ及び500 nMのNADPを1 M トリス-HCl、pH 7.9、バッファーと共に加えて5.25 mlの30 mM トリス-HClを得る。10 gの製粉を酵素系と30℃のマイクロファリノグラフ中で混合することにより反応を行う。ファリノグラフ測定により、添加したNADP-チオレドキシン系による小麦様

ドウ特性が示される。酵素系のない対照においては、混合物がドウを形成しないためにマイクロファリノグラフの読みは不可能である。形成されるドウは粘り強く、そのコンシステンシーは実験中維持される。最終生成物は、小麦から得られたドウに形成された網目構造と同じである。

#### 動物毒素の還元

本発明は、ミツバチ、サソリ及びヘビ毒に含まれる、毒性の原因となるタンパク質を化学的に還元してそれらの毒の生物活性を変えかつ動物毒、詳しくはヘビ神経毒の毒性をチオールレドックス (SH) 剤、即ち、還元チオレドキシニン、チオレドキシニンの存在下のリボ酸又はDTTによって還元する方法を提供する。チオレドキシニンの還元は、好ましくはNADP-チオレドキシニン系 (NTS) を経て起こる。前述のように、NTSは、NADP、NADP-チオレドキシニンレダクターゼ (NTR) 及びチオレドキシニンを含む。

“チオールレドックス剤”という語は、非還元状態及び還元又はスルフヒドリル (SH) 状態における試薬を共に表すために文献ではよく用いられてきた。本明細書で定義される“チオールレドックス (SH) 剤”は、還元したチオールレドクスタンパク質又はDTTのような合成で調製した物質を意味する。

神経毒の還元は、血液、リンパ液又はバッファー等のような液体の媒質又は細胞又は他の生物組織のような固体の媒質中で行われる。本明細書で用いられる“液体”という語は、それだけで個体内にある生物学的液体を意味しない。

おそらく、試験管内で毒液を不活性化し個体内で毒液を解毒するチオールレドックス (SH) 剤の熟達は、これらの毒性の原因となる毒成分における分子内ジスルフィド結合を還元する本発明の試薬の能力に左右されるであろう。

シナプス前及びシナプス後双方のヘビ神経毒は全て、本発明のチオールレドックス (SH) 剤により試験管内で還元され、少なくとも部分的に不活性化される。本発明に従って試験管内で不活性化されたヘビ神経毒は、抗毒素の調製に抗原として有効である。神経毒は、好ましくは、チオールレドックス (SH) 剤と適切なバッファー中でインキュベートすることにより不活性化される。好ましいバッファーはトリス-HClバッファーであるが、リン酸塩バッファーのような

他のバッファーも用いられる。好ましいチオールレドックス (SH) 剤は還元チオレドキシンである。

ヘビ神経毒を不活性化するのに有効な量は、 $100\mu\text{l}$  の容量中  $10\mu\text{g}$  のヘビ神経毒に対して約  $0.1\sim5.0\mu\text{g}$ 、好ましくは約  $0.5\sim1.0\mu\text{g}$  の還元チオレドキシン；約  $1.0\mu\text{g}$  のチオレドキシンの存在下の約  $1\sim20\text{nM}$ 、好ましくは  $5\sim15\text{nM}$  の還元リボ酸及び約  $10\sim200\text{nM}$ 、好ましくは  $50\sim100\text{nM}$  の還元DTT（好ましくは約  $1.0\mu\text{g}$  のチオレドキシンの存在下）の範囲である。

NADP-チオレドキシン系の成分を用いてヘビ神経毒を不活性化するのに有効な量は、 $100\mu\text{g}$  の容量中  $10\mu\text{g}$  のヘビ神経毒に対して約  $0.1\sim5.0\mu\text{g}$ 、好ましくは約  $0.5\sim1.0\mu\text{g}$  のチオレドキシン；約  $0.1\sim2.0\mu\text{g}$ 、好ましくは  $0.2\sim1.0\mu\text{g}$  のNTR及び約  $0.05\sim0.5\text{nM}$ 、好ましくは約  $0.1\sim0.25\text{nM}$  のNADPHの範囲である。

不活性化の際、不活性化神経毒及びチオールレドックス (SH) 剤等を含むバッファーは、ウマのような動物に注射されるか又は注射前に加熱又はホルムアルデヒドで処理される。

本発明のチオールレドックス (SH) 剤は、また、毒ヘビのかみ傷による神経毒性の作用を受けている個体を治療するために用いられる。還元チオールレドックス (SH) 剤の個体への好ましい投与方法は、ヘビのかみ傷のまわりに多数回皮下注射する方法である。

個体において神経毒を解毒するために用いられるチオールレドックス (SH) 剤の正しい量は、かみ傷から個体に実際に入った毒素量によることは当然のことである。しかしながら、マウスにおけるヘビ神経毒の毒性を解毒又は還元するのに有効な量は、マウスの体重  $1\text{g}$  に対して通常約  $0.01\sim0.3\mu\text{g}$ 、好ましくは約  $0.02\sim0.05\mu\text{g}$  の還元チオレドキシン；約  $0.05\mu\text{g}$  のチオレドキシンの存在下の約  $0.1\sim3.0\text{nM}$ 、好ましくは  $0.2\sim1.0\text{nM}$  の還元リボ酸；好ましくは約  $0.05\mu\text{g}$  のチオレドキシンの存在下の約  $1.0\sim30$  ナノモル、好ましくは  $2.0\sim5.0$  ナノモルのDTTの範囲である。



NADP-チオレドキシン系の成分を用いてマウスにおけるヘビ神経毒を解毒するのに有効な量は、マウスの体重1gに対して約0.01~0.3 $\mu$ g、好ましくは約0.02~0.05 $\mu$ gのチオレドキシン；約0.005~0.12 $\mu$ g、好ましくは0.01~0.025 $\mu$ gのNTR及び約5~30nM、好ましくは10~15nMのNADPHの範囲である。

個体にNTSを投与する好ましい方法も、多数回皮下注射する方法である。ヒト使用に好ましいチオールレドックス剤は、NADP-チオレドキシン系を経て又はリポ酸もしくはDTTと共に投与されるヒトチオレドキシンである。

本発明の方法によって不活性化又は解毒される神経毒を生じる毒ヘビの一部の表は、Chippaur, J. -P.ら(1991)Reptile Venoms and Toxins, A.T. Tu, ed., Marcel Dekker, Inc., p.529-555に見られ、参考として本明細書に引用する。

不活性化及び解毒する毒液についての本発明の他の特徴及び利点は、下記の実施例から明らかにされる。

#### 実施例 26

##### ミツバチ、サンリ及びヘビ毒の還元実験及びmBB rによる標識

次のプロテアーゼインヒビター：フェニルメチルスルホニルフルオリド（PM SF）、ロイペプチン及びペプスタチン（分析に用いられる最終濃度：100 $\mu$ M、1 $\mu$ M及び1 $\mu$ M）を含有する30mMトリス-HClバッファーpH7.9中50 $\mu$ gの毒液（最終容量100 $\mu$ l）を用いて反応を行った。還元剤としてNADPHを用い、混合液は4 $\mu$ lのチオレドキシン、3.5 $\mu$ gのNTR（共に大腸菌由来）及び12.5mMNADPHを含有した。チオレドキシン（4 $\mu$ g、大腸菌又はヒト）をDTTで還元した場合、NADPH及びNTRを除き、DTTを0.5mMまで加えた。GSHを用いる分析は、最終濃度5mM及び1.5 $\mu$ gグルタチオンレダクターゼ及び12.5mMNADPHの存在以外は同様に行った。混合液を室温で20分間インキュベートし、次に、mBB rを1.5mMまで加え、室温で15分間反応を続けた。反応を停止し、10 $\mu$ lの100mM $\beta$ -メルカプトエタノール、5 $\mu$ lの20%SDS及び10 $\mu$ lの50%グリセロールを加えることにより過剰のmBB rを誘導した。次に、試料をSDSポリアクリルアミ

ドゲル電気泳動で前述のように分析した。

NAD P-チオレドキシン系を用いて同様の実験をプロテアーゼインヒビターを加えずに行った。

別の還元剤を用いプロテアーゼインヒビターの存在下に室温で20分インキュベートした後、試料をmBBrを用いて誘導し、電気泳動で分離し、蛍光を求めた。全ての場合に、チオレドキシン（大腸菌又はヒト）が毒液の成分を特異的に還元することが示された。ゲルも、プロテアーゼインヒビターを存在させずに反応を行った場合に同様の方法でチオレドキシンが毒成分を還元することを示した。

プロテアーゼインヒビターを存在させて又は存在させずにNAD P-チオレドキシン系によるミツバチ、サソリ及びヘビ毒の還元もまた、SDS-ポリアクリルアミドゲルmBBr法を用いて示された。プロテアーゼインヒビターの存在又は不在下にNTSと室温で20分インキュベートした後、試料をmBBrで誘導し、電気泳動で分離し、蛍光を前述のように求めた。

#### 材料

毒液： アピス・メリフェラ (*Apis mellifera*) 由来のミツバチ毒、アンドロクトヌス・オーストラリス (*Androctonus australis*) 由来のサソリ毒及びブンガルス・ムルチシノクトス (*Bungarus multicinctus*) 由来のヘビ毒をSigma chemical

Co. (ミズリー州セントルイス) から購入した。

プロテアーゼインヒビター： フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF)、ロイペプチン及びペプスタチンをSigma chemical Co. (ミズリー州セントルイス) から購入した。

#### 毒液の解毒

ミツバチ、サソリ及びヘビ毒の解毒を、マウスに皮下注射することにより求める。分析は3回の実験で行われる。注射の前に、毒液をリン酸塩-食塩水バッファー ( $10\text{ mM Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7.2 中  $0.15\text{ M NaCl}$ ) にLD<sub>50</sub> (マウス1gあたり) の2倍までの範囲の濃度で希釈する：アピス・メリフェラ由来のミツバチ毒、 $2.8\text{ }\mu\text{g}$ ；アンドロクトヌス・オーストラリス由来の

サソリ毒、 $0.32 \mu\text{g}$ ；及びブンガルス・ムルチシノクトス由来のヘビ毒、 $0.16 \mu\text{g}$ 。注射の5分、10分、30分、60分、4時間、12時間及び24時間後に、抗原投与したマウスの別々のグループに（1）静脈内及び（2）皮下（最初の注射位置のまわりに多数回局所注射）注射する。チオレドキシンを、（1） $0.08 \mu\text{g}$ のチオレドキシン、 $0.07 \mu\text{g}$ のNTR及び $25 \text{ nM}$ のNADPHを用いる大腸菌NADP-チオレドキシン系；（2）DTT又は還元リボ酸で還元したチオレドキシン（ $0.08 \mu\text{g}$ の大腸菌又はヒトチオレドキシンを $1 \text{ nM}$ のジチオトレイトール又は $1 \text{ nM}$ の還元リボ酸に加えた）を用いて還元する。濃度は、動物に注射した毒液 $\mu\text{g}$ による；溶液は全てリン酸塩-食塩水バッファー中で調製される。

解毒に対するチオレドキシンの効果は、（1） $\text{LD}_{50}$ をチオレドキシンを存在させない対照グループと比較する及び（2）動物に対する壊死、膨潤及び全身の不快感によって証明される局所反応の程度を追跡することにより求められる。

#### ヘビ神経毒を還元する還元実験-材料及び方法

##### 毒素

ブタ膵臓ホスホリパーゼ $A_2$ 、エラプトキシンb及び $\beta$ -ブンガロトキシンをSigma Chemical Co.（ミズリー州セントルイス）から購入した。ホスホリパーゼ $A_2$ が $3.2 \text{ M}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液 $\text{pH } 5.5$ で供給されたので、セントリコン3kDa区分膜を用いて $30 \text{ mM}$ トリス-HClバッファー、 $\text{pH } 7.9$ 中でタンパク

質を透析した。 $\alpha$ -ブンガロトキシン及び $\alpha$ -ブンガロトキシン $^{125}\text{I}$ は、Dr. S. halla Verrallから恵与された。

##### 試薬及び精化学薬品

DL- $\alpha$ -リボ酸、ダイズのL- $\alpha$ -ホスファチジルコリン、NADPH及び $\beta$ -メルカプトエタノールをSigma Chemical Co.（ミズリー州セントルイス）から、モノプロモビマン（mBBr、商品名チオライト）をCalbiochem（カリフォルニア州サンディエゴ）から購入した。ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）ポリアクリルアミドゲル電気泳動用試薬をBio-Rad Laboratories（カリフォルニア州リッチモンド）から購入した。

### タンパク質及び酵素

Jiaoら(1992)Ag. Food Chem. (印刷中)に記載されるようにチオレドキシン及びNTRを大腸菌から精製した。チオレドキシンhを小麦胚芽から精製し(Florencio F.J. ら(1988)Arch Biochem. Biophys. 266:496-507)、チオレドキシンf及びmをホウレンソウの葉から精製した(上記Florenco F.J.ら)。ヒトチオレドキシンは、Dr. Emmanuelle Wollmanから恵与された。NADP-リンゴ酸デヒドロゲナーゼをコーンの葉から精製し(Jacquot, J.-P.ら(1981)Plant Physiol. 68:300-304)、グルタチオンレダクターゼをホウレンソウの葉から精製した(上記Florenco F.J.ら)。大腸菌グルタレドキシンは、Prof. A. Holmgrenから恵与された。

### SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を1.5 mm厚の10~20%勾配ゲル中で行い、40 mAの定電流で3時間展開した。電気泳動後、ゲルを12%(w/v)トリクロロ酢酸に2時間浸漬し、次に、40%メタノール及び10%酢酸を含む溶液に12時間移して過剰のmBBRを除去した。紫外光源(365 nm)を備えたライトボックス上に載せてタンパク質結合mBBRの蛍光を求めた。ポラロイドポジ/ネガランドフィルム55型で黄色ラッテンゼラチンフィルター No. 8(区分=460 nm)(露光時間40秒、f 4.5)を通してゲルの写真をとった。ゲル中のタンパク質を10%酢酸及び40%メタノール中0.125%(w/v)クーマシーブルーR-250の溶液中で1時間染色した。クーマシーブルーを除く同じ溶液

中でゲルを脱染した。蛍光ゲル及び乾燥染色ゲルのポラロイドネガをレーザー濃度計(Pharmacia-LKB Ultrosan XL)を用いて走査した。ゲルスキャンXLソフトウェアを用いてピークの領域又は高さを計算してバンドを定量した。

### 実施例 27

#### 毒素の還元及びmBBRによる標識

0.8  $\mu$ g のチオレドキシン、0.7  $\mu$ g のNTR(共に大腸菌由来)及び2.5 mM NADPHを含む30 mM トリス-HCl バッファー、pH 7.9の最終容量

100  $\mu$ l 中10  $\mu$ g の標的毒素を用いて反応を行った。チオレドキシンをDTTで還元する場合、NADPH及びNTRを除き、DTTを0.5 mMまで加えた。GSHを用いる分析は、最終濃度1 mM以外は同様に行った。グルタレドキシンによる還元については、チオレドキシン及びNTRを1  $\mu$ g の大腸菌グルタレドキシン、0.38  $\mu$ g のグルタチオンレダクターゼ(ホウレンソウの葉から部分精製した)、1 mM GSH及び2.5 mM NADPH (これらの4成分の組合わせはNADP/グルタレドキシン系と呼ばれる)で置き換えた。還元形のリポ酸による還元は、2種類の濃度、100  $\mu$ M及び200  $\mu$ M、共に単独の100  $\mu$ l の容量中で0.8  $\mu$ g のチオレドキシンを用いて行った。混合液を、エラプトキシンb及び $\alpha$ -ブングロトキシンの場合には37℃で2時間、 $\beta$ -ブングロトキシンの場合には室温で1時間及びホスホリパーゼA<sub>2</sub>の場合には室温で20分間インキュベートした。インキュベートした後、mBBRを1.5 mMに加え、反応を室温で15分間続けた。反応を停止し、10  $\mu$ l の100 mM  $\beta$ -メルカプトエタノール、5  $\mu$ l の20% SDS及び10  $\mu$ l の50%グリセロールを加えることにより過剰のmBBRを誘導した。次に、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で試料を分析した。

試料を2 mM DTT中で3分間煮沸することにより全毒素の還元が達成された。冷却後、試料をmBBRで標識し、全試料を2分間更に煮沸した後にゲルに装填する以外は前のように処理した。2-メルカプトエタノール及びグルタチオンのようなモノチオール還元剤に対してジチオトレイトール (DTT) 及び還元形のチオレドキシンとリポ酸はジチオール還元剤である。DTTは合成した化学物質であり、チオレドキシン及びリポ酸は細胞内で産生する。エラプトキシンbは、

NTS、DTT及びチオレドキシン並びに還元リポ酸及びチオレドキシンで顕著に還元された。エラプトキシンbにおいては、リポ酸がジチオトレイトールより特異的な還元剤であることが示された。ジチオトレイトールは、チオレドキシンを存在させずに部分的に毒素を還元したが、還元リポ酸は還元しなかった(レーン8)。結果から、NTS又はDTT+チオレドキシンが $\alpha$ -ブングロトキシン及び $\beta$ -ブングロトキシンの特異的還元剤であることがわかった。

## 実施例 2 8

### NADP-リンゴ酸デヒドロゲナーゼの活性化

ヘビ毒の葉緑体NADP-リンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性化能を、 $5\mu\text{g}$ の毒素を制限チオレドキシニン濃度(チオレドキシニンによる酵素の活性化を制限するために):大腸菌チオレドキシニン、 $0.25\mu\text{g}$ ;ヒトチオレドキシニン、 $0.9\mu\text{g}$ ;小麦、 $1.15\mu\text{g}$ ;ハウレンソウ f 及び m、各々  $0.375\mu\text{g}$  及び  $0.125\mu\text{g}$  とブレインキュベートすることにより行った。精製コーンNADP-リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、 $1.4\mu\text{g}$ を $100\text{mM}$ トリス-HCl、pH 7.9、指示されたチオレドキシニン及び $10\text{mM}$ DTTを含有する溶液に加えた(最終容量 $0.2\text{ml}$ )。25分後、 $160\mu\text{l}$ のブレインキュベーション混合液を $100\text{mM}$ トリス-HCl、pH 7.9及び $0.25\text{mM}$ NADPHを含有する( $0.79\text{ml}$ 中) $1\text{ml}$ 容量の $1\text{cm}$ キュベットに注入した。 $50\mu\text{l}$ の $50\text{mM}$ オキサロ酢酸を加えることにより反応を開始した。4方式チャネル変換を備えたベックマン分光光度計で $340\text{nm}$ の吸光度の変化をモニターすることによりNADP酸化を行った。本実験の結果から、エラプトキシニンbの異なった還元チオレドキシニンによる還元がNADP-リンゴ酸デヒドロゲナーゼを活性化する毒素の生物活性を著しく変えることがわかった。結果から、有効性の違いはあるが、試験した全てのチオレドキシニンが毒素の作用を制限するのにある程度機能することが証明される。

## 実施例 2 9

### エラプトキシニンbのタンパク質分解分析

エラプトキシニンb、 $10\mu\text{g}$ を $30\text{mM}$ トリス-HClバッファーpH 7.9と $37^\circ\text{C}$ で2時間インキュベートした(全容量、 $100\mu\text{l}$ )。指示されたように、バッファーを $0.8\mu\text{g}$ のチオレドキシニン、 $0.7\mu\text{g}$ のNTR及び $2.5\text{mM}$ NADP

Hで補足した。チオレドキシニンをDTTで還元する場合、NTRとNADPHを除き、DTTを $0.5\text{mM}$ まで加えた。インキュベーション後、試料を $0.4\mu\text{g}$ 及び $2\mu\text{g}$ のトリプシンで $37^\circ\text{C}$ において10分間消化した。DTT、 $4.8\mu\text{l}$ の $50\text{mM}$ 溶液、 $5\mu\text{l}$ の20%SDS及び $10\mu\text{l}$ の50%グリセロールを加え

、試料を3分間煮沸し、次に、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。ゲルをクーマシーブルーで染色し、タンパク質バンドを上記のようにデンシトメトリー走査で定量した。分析の結果を下記表16に示す。これらの結果から、ヘビ神経毒（エラプトキシンb）の還元が毒素をタンパク質分解に更に感受性にすることがわかる。この結論を拡大すると、還元チオレドキシンを解毒剤として投与すると毒液のプロテアーゼによるタンパク質分解不活性化の増大による毒素を破壊するように援助することが示される。

表16

## トリプシンに対する酸化及び還元形のエラプトキシンbの感受性

処理	エラプトキシンb消化 %	
	トリプシン0.4 $\mu$ g	トリプシン2 $\mu$ g
対照	0.0	34.1
還元、NTS	21.1	57.8
還元、DTT	3.1	40.6
還元、DTT+Tr x	28.0	71.8

エラプトキシンb、10  $\mu$ gを、次の通りに30 mM トリス-HCl バッファー、pH 7.9 中37℃で2時間ブレインキュベートした：対照、添加なし；大腸菌NADP/チオレドキシン系（NTS）、チオレドキシン、NTR及びNADPHで還元；DTT、DTTで還元；及びDTT+チオレドキシン、大腸菌チオレドキシンで補足したDTTで還元。ブレインキュベーション後0.4  $\mu$ g及び2  $\mu$ gのトリプシンを指示されたものに加え、次に、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した。

## 実施例30

ホスホリパーゼA<sub>2</sub>分析

$\beta$ -ブンガロトキシンの酸化及び還元形のホスホリパーゼA<sub>2</sub>成分の活性を、Lobo de Araujo et al. (1987) Toxicon 25:1181-1188 に記載されるように酸性度の変化を分光光度法で追跡して求めた。還元実験については、10  $\mu$ gの毒素を0.8  $\mu$ gのチオレドキシン、0.7  $\mu$ gのNTR及び7 mM NADPHを含有する30 mM

Mトリス-HClバッファー、pH 7.9 (最終容量、 $35 \mu\text{l}$ ) 中でインキュベートした。室温で1時間インキュベートした後、 $20 \mu\text{l}$  の反応混合液を  $10 \text{ mM}$  CaCl<sub>2</sub>、 $100 \text{ mM}$  NaCl、 $4 \text{ mM}$  胆汁酸ナトリウム、 $175 \mu\text{M}$  ダイズホスファチジルコリン及び  $55 \mu\text{M}$  フェノールレッドを含有する  $1 \text{ ml}$  の分析溶液 (pH 7.6 に調整した) を含む  $1 \text{ cm}$  キュベットに加えた。ベックマンデュ2400型分光光度計で  $558 \text{ nm}$  の吸光度の変化を測定することにより反応を行った。本実験結果から、 $\beta$ -ブンガロトキシシンがチオレドキシシンで還元される場合にホスホリパーゼ活性のほとんどを消失することが示された。結果は、ヘビのかみ傷後に還元チオレドキシシンを投与するとホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 活性を消退させることにより毒素を解毒するのに役立つという結論と一致している。

### 実施例 3 1

#### アセチルコリンレセプターに結合する $\alpha$ -ブンガロトキシシン

$\alpha$ -ブンガロトキシシン結合を、放射能標識毒素を用いてマウス培養細胞により分析した (Gu, Y. ら (1985) J. Neurosci. 5:1909-1916)。マウス細胞、C<sub>2</sub>系を Gu ら (上記 Gu, Y. ら) に記載されるように増殖し、24 ウェルプラスチック組織培養プレート (Falcon) に1ウェルあたり約3000細胞の密度で塗布した。48時間及び96時間後に増殖培地を融合培地と交換した。2日間増殖した後、培養物を分析に用いた。

$\alpha$ -ブンガロトキシシン結合を、3種類の異なる処理に供した細胞を用いて求めた: [A]  $10 \text{ nM}$   $\alpha$ -ブンガロトキシシン<sup>125</sup>I ( $262 \text{ Ci/ミリモル}$ ) を  $4 \mu\text{g}$  のチオレドキシシン、 $3.5 \mu\text{g}$  の NTR (共に大腸菌由来) 及び  $6.25 \text{ mM}$  NADPH を含む  $200 \mu\text{l}$  のリン酸塩-食塩バッファー ( $10 \text{ mM}$  Na<sub>2</sub>HSO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.2 中  $0.15 \text{ M}$  NaCl) 中  $37^\circ\text{C}$  で2時間プレインキュベ

ートした。ある場合には、NTRとNADPHを  $1.25 \text{ mM}$  DTTで置き換えた。2時間インキュベートした後、混合液をマウス細胞を含むウェルに移し、リン酸塩-食塩水で2回洗浄し、 $37^\circ\text{C}$  で2時間インキュベートした。[B] 細胞をリン酸塩-食塩水バッファーで2回洗浄した後、1ウェルに対して  $10 \text{ nM}$   $\alpha$ -ブンガロトキシシン<sup>125</sup>I ( $200 \mu\text{l}$  のリン酸塩-食塩水中) を加えた。 $37^\circ\text{C}$  で



2時間インキュベートした後、細胞をリン酸塩-食塩水バッファーで洗浄して結合していない毒素を除去した。指示されたように、 $0.68\text{ mM CaCl}_2$ 、 $0.49\text{ mM MgCl}_2$ 、 $4\text{ }\mu\text{g}$  のチオレドキシン、 $3.5\text{ }\mu\text{g}$  のNTR及び $6.25\text{ mM}$  NADPHで補足した $200\text{ }\mu\text{l}$  の食塩水をウェルに添加した。プレートを $37^\circ\text{C}$ で2時間インキュベートした。DTTによる処理からNTR及びNADPHを除いて $1.25\text{ mM}$ で加えた。[C] 細胞をリン酸塩-食塩水バッファーで2回洗浄した後、 $4\text{ }\mu\text{g}$  のチオレドキシン、 $3.5\text{ }\mu\text{g}$  のNTR及び $6.25\text{ mM}$  NADPHを含有する $200\text{ }\mu\text{l}$  の溶液を各ウェルに加えた。ある場合には、NTR及びNADPHを $1.25\text{ mM}$  DTTに置き換えた。プレートを $37^\circ\text{C}$ で2時間インキュベートした。次に、細胞をリン酸-食塩水バッファーで2回洗浄して添加した還元剤を除去した。 $0.68\text{ mM CaCl}_2$ 及び $0.49\text{ mM MgCl}_2$ を含有するリン酸-食塩水バッファー、 $200\text{ }\mu\text{l}$  及び $10\text{ nM}$   $\alpha$ -ブングロトキシン $^{125}\text{I}$ を各ウェルに加えた。インキュベーションを $37^\circ\text{C}$ で2時間続けた。本分析の結果を表17に示す。本実験から、チオレドキシンで還元した場合に $\beta$ -ブングロトキシンがアセチルコリンレセプターにもはや結合できないことがわかる。動物全体に達すると、チオレドキシン結合還元機構により毒素の標的レセプターへの結合を消退させることによる解毒がもたらされる

各 $\alpha$ -ブングロトキシン結合分析を3回の実験で行った。 $100$ 倍過剰量の標識していない $\alpha$ -ブングロトキシンをインキュベーション混合液に加えることにより非特異的結合を測定した。インキュベーション後、全ての場合の細胞をリン酸-食塩水で洗浄して結合していない毒素を除去した。細胞を $0.1\text{ M NaOH}$ に可溶化し $\gamma$ カウンターで放射能を測定することにより毒素の結合量を求めた。

表17

 $\alpha$ -ブンガロトキシンのマウス細胞のアセチルコリンレセプターへの結合

処理A		結合 %	
毒素 + 還元剤	細胞	2時間、37°C	停止
		2時間、37°C	
還元剤なし			100.0
NTS			0.0
DTT+チオレドキシン			0.0
NTS-NTR			63.0
NTS-チオレドキシン			78.0
NTS-NADPH			101.0

処理B

毒素 + 細胞	洗浄細胞	+還元剤	停止
		2時間、37°C	
還元剤なし			100.0
NTS			78.0
DTT+チオレドキシン			76.0

処理C

毒素 + 還元剤	洗浄細胞	+毒素	停止
		2時間、37°C	
還元剤なし			100.0
NTS			68.7
DTT			85.0
DTT+チオレドキシン			68.8

大腸菌NTS：チオレドキシン、NTR及びNADPH

実施例32動物における解毒の例

ヘビ神経毒の解毒を、マウスに皮下注射することにより求める。3回の実験で分析を行う。注射前に、毒素をリン酸-食塩水バッファー（ $10\text{ mM Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7.2 中  $0.15\text{ M NaCl}$ ）にLD<sub>50</sub>投与量の2倍までの範囲の濃度で希釈する。（LD<sub>50</sub>は投与された動物グループの50%を死滅させる毒素量として定義される。）毒性試験については、次の神経毒濃度がLD<sub>50</sub>（マウス1gあたり）に相当する：エラプトキシシンb、 $0.05 \sim 0.15\text{ }\mu\text{g}$ ； $\alpha$ -ブンガロトキシシン、 $0.3\text{ }\mu\text{g}$ ；及び $\beta$ -ブンガロトキシシン、 $0.089\text{ }\mu\text{g}$ 。注射の5分、10分、30分、60分、4時間、12時間及び24時間後、抗原投

与したマウスの別々のグループに（１）静脈内及び（２）皮下（初回の注射位置のまわりに多数回局所注射する）注射する。チオレドキシンを（１）大腸菌 NAD P-チオレドキシン系、 $0.08 \mu\text{g}$  のチオレドキシン、 $0.07 \mu\text{g}$  の NTR 及び  $25$  ナノモルの NADPH を用いる；（２）チオレドキシン +  $1 \sim 2$  ナノモルの還元リボ酸、 $0.08 \mu\text{g}$  の大腸菌チオレドキシン又は  $0.20 \mu\text{g}$  ヒトチオレドキシンを用いる、及び（３） $0.08 \mu\text{g}$  の大腸菌チオレドキシン又は  $0.20 \mu\text{g}$  ヒトチオレドキシンと  $5$  ナノモルのジチオトレイトールを用いる（濃度は動物に注射した毒素  $1 \mu\text{g}$  に対する；溶液は全てリン酸-食塩水バッファー中で調製する）。

解毒に関するチオレドキシンの効果を、（１）LD<sub>50</sub> をチオレドキシンを含まない対照グループと比較する；（２）動物に対する壊死、膨潤及び全身の不快感で証明される局所反応の程度を追跡する；（３）クレアチンキナーゼ、組織損傷の指標の血清レベルを追跡することにより求める。筋細胞の切断の結果として血液中に遊離するクレアチンキナーゼを、Sigma Chemical Co. (ミズリー州セントルイス) から入手した標準分析キットを用いてモニターする。

ヘビのかみ傷の症状は複合症状であり、種々の要因による。結果として患者ごとに異なる。それでもヒトにおいてチオレドキシン治療が軽減しなければならない共通の症状がある。詳細には、チオレドキシン治療は、神経毒作用及びヘビのかみ傷から生じる関連の作用を伴う症状を軽減しなければならない。かみ傷のまわりの膨潤及び浮腫、疼痛及び水疱の減少；正常な脈搏数の回復；かみ傷面の壊死の回復；患部の最小化が含まれる。これらの症状の最小化は、患者の全身の健康と状態の改善をもたらさなければならない。

#### 食物アレルギーの還元

本発明は、主要な食物アレルギータンパク質中のジスルフィド結合を化学的に還元しかつそれらのタンパク質を含む食物を摂取する場合に起こるアレルギー発現性を低下又は消退させる方法を提供するものである。ジスルフィド結合は、チオレドキシンによりスルフヒドリル (SH) レベルに還元される。他の主な細胞チオール還元剤、グルタチオンは、この能力に不活性である。タンパク質は、酸化 (S-S) 状態でアレルギー発現に活性であり、チオレドキシン (SH 状態)

で治療される場合にはアレルギー発現性を消失する。チオレドキシンは、酵素NADP-チオレドキシンレダクターゼ（生理的状态）を経るNADPH或いはジチオトレイトール、合成化学還元剤で活性化（還元）される場合にこの還元を達成する。

おそらく、食物に起因するアレルギー発現性を低下又は消退させる還元チオレドキシンの熟達は、食物中のアレルゲンタンパク質中の分子内ジスルフィド結合を還元する還元チオレドキシンの能力に左右されるであろう。

食物を有効な温度で有効な時間チオレドキシンで処理する場合、分子内ジスルフィド結合を有する食物アレルゲンタンパク質を還元しかつこれらのタンパク質を含む食物のアレルギー発現性を還元チオレドキシンで少なくとも低下させることができる。食物をインキュベートする好ましい温度は、ほぼ室温から37℃までであるが、ジスルフィド結合の還元を可能にする温度が許容できる。インキュベーション時間は、好ましくは約20分～2時間、更に好ましくは約30分～1時間30分である。しかしながら、タンパク質は、例えば、5℃で48時間インキュベートすることによっても還元される。

還元チオレドキシンで処理する際にアレルギー発現性の低下を示す食物の例は、牛肉、牛乳、ダイズ、卵、米、小麦及び牛肉である。

哺乳動物によって摂取された食物のアレルギー発現性を低下させる好ましい方法は、NADP-チオレドキシン系（NTS）中の成分を用いて食物を前処理又はインキュベートする方法である。成分の効果的な量は、食物中25mgのタンパク質に対して約12.5～750 $\mu$ g、好ましくは約200～400 $\mu$ gのチオレドキシン；約12.5～375 $\mu$ g、好ましくは約100～200 $\mu$ gのNTR及び約1.5～30 $\mu$ M、好ましくは約5～20 $\mu$ MのNADPHの範囲である。

個々の食物のアレルギー発現性を低下させることに関する本発明の他の特徴及び利点は、下記の実施例から確認される。

### 実施例 3 3

#### 牛乳、ダイズ、小麦及び牛肉のチオレドキシンによる処理

本実験については、製品、1：20重量／容量（w/v）、牛乳アレルゲンエキス（カタログNo.3390JG, Miles, Inc., インディアナ州エルクハート）の1：5生

理食塩水 (PBS) 希釈液、製品、1:10 w/v、ダイズアレルゲンエキス (カタログNo.3597ED, Miles, Inc., インディアナ州エルクハート) の1:10 PBS希釈液及び製品、1:10 w/v、小麦アレルゲンエキス (カタログNo.3708ED, Miles, Inc., インディアナ州エルクハート) の1:5 PBS希釈液を調製した。製品、1:10 w/v、市販の牛肉アレルゲンエキス (カタログNo.3078JF, Miles, Inc., インディアナ州エルクハート) の1:5 PBS希釈液も調製した。

牛乳の場合には、0.1 mlの希釈液を、NADP/チオレドキシン系 (NTS) で処理し、この場合にはアレルゲンを4.8  $\mu$ gのチオレドキシン、4.2  $\mu$ gのNTR及び1 mM NADPHと (最終容量、0.2 ml) インキュベートする工程を含んだ。第2試料は、1.5 mM DTT及び4.8  $\mu$ gのチオレドキシンとインキュベートした0.1 mlの希釈した牛乳アレルゲンを用いて (最終容量、0.2 ml) 調製した。本実施例及び下記の実施例における実験を含むアレルゲンの実験では全て、使用したチオレドキシンとNTRを、タンパク質を過剰生産するために形質転換された大腸菌から以前に記載されたように精製した (de la Motte-Guery, F.ら (1991) Eur. J. Biochem. 196:287-294, Russel, M.ら (1988) J. Biol. Chem. 263:9015-9019)。ダイズ及び小麦については、0.05 mlの希釈液を2.4  $\mu$ gのチオレドキシン、2.1  $\mu$ gのNTR及び1 mM NADPHとインキュベートした。更に、PBSの同じ処理をした対照試料を調製した。DTT処理ダイズ及び小麦試料を1.5 mM DTT及び2.4  $\mu$ gのチオレドキシンとインキュベートした0.05 mlの別々のアレルゲン希釈液を用いて調製した。対照試料並びに全てのダイズ及び小麦試料の最終容量は、0.1 mlとした。牛乳及び小麦標品を室温で25分間インキュベートし、ダイズ標品を37℃で1時間25分インキュベートした。牛肉においては、0.05 mlの希釈液を2.4  $\mu$ gのチオレドキシン、2.1  $\mu$ gのNTR及び1 mM NADPHと (最終容量、0.1 ml) 37℃で25分間インキュベートした。他の0.05 ml試料を、室温以外は同じ方法で処理した。インキュベーション後、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ 又は $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^7$ の範囲の1 mlの希釈液を、各種処理食物エキス標品として調製した。希釈した試料を30分以内に試験に用いた。

#### 実施例 3 4

mBB r 蛍光標識 / SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いる NAD P / チオレドキシン系による、食物アレルギーの還元及びタンパク質分解増進の定量

本実験については、実施例 3 3 に記載された製品の牛乳、牛肉及び小麦エキスの PBS による 1 : 2.5、1 : 5 及び 1 : 1.5 希釈液を各々調製した。50  $\mu$ l のこれらの希釈液に 2.4  $\mu$ g のチオレドキシン、2.1  $\mu$ g の NTR 及び 1 mM NADPH を加えた (最終容量、0.1ml)。対照は、50  $\mu$ l の個々の希釈エキス及び 50  $\mu$ l の PBS からなるものとした。標品を、室温及び 37℃ で 25 分間インキュベートした。インキュベーション後、8  $\mu$ l の 80 mM mBB r を加え、室温で 15 分間反応を続けた。反応を停止し、10  $\mu$ l の 100 mM  $\beta$ -メルカプトエタノール、10  $\mu$ l の 20% SDS 及び 10  $\mu$ l の 50% グリセロールを加えて過剰量の mBB r を誘導した。試料を、以前に記載された mBB r / SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分析した。結果から、NTS が室温及び 37℃ 双方においてアレルギーエキス中のタンパク質を効果的に還元することがわかった。更に、実施例 3 3 に記載されたダイズの製品エキスの PBS 希釈液を NTS で同様に処理した実験では、mBB r 標識 / SDS-PAGE 法を用いる分析から、チオレドキシンがダイズタンパク質を還元することがわかった。しかしながら、ダイズ、牛乳、小麦、卵及び牛肉アレルギータンパク質をグルタチオン、グルタチオンレダクターゼ及び NADPH とインキュベートした場合、処理アレルギータンパク質をほとんど或いは全く還元しなかった。

同様に、市販の米アレルギーエキス (カタログ No. 3549ED, Miles, Inc. インディアナ州エルクハート) の PBS 希釈液を NTS とインキュベートし、mBB r / SDS-PAGE 法を用いて分析して還元チオレドキシンが米アレルギータンパク質を還元することを示す。

別の実験では、NTS で還元されておりトリプシンとインキュベートした実施例 3 3 に記載された市販のエキスからの食物アレルギータンパク質が NTS で処理されなかった対照よりタンパク質分解に対する感受性を高めたことが認められた。還元の分析は、mBB r / SDS-PAGE 法を用いて行われた。更に、本

実験では、 $10\mu\text{g}$ のNTS還元精製乳アレルゲンタンパク質、 $\beta$ -ラクトグロブリン(Shigma Chemical Co.)を $2\mu\text{g}$ のトリプシンで処理する場合、タンパク質分解は同じトリプシン処理酸化 $\beta$ -ラクトグロブリンのわずか50%と比べて100%であった。 $10\mu\text{g}$ の他の精製乳アレルゲン、酸化 $\alpha$ -ラクトアルブミン(Shigma Chemical Co.)を $2\mu\text{g}$ のトリプシンと同様に処理する場合、注目すべきタンパク質分解がなかった。しかしながら、NTSで還元した $10\mu\text{g}$ の精製 $\alpha$ -ラクトアルブミンは、トリプシンで80%タンパク質分解した。また、 $0.8\mu\text{g}$ のチオレドキシン及び $0.5\text{mM}$ DTTで還元した $10\mu\text{g}$ の $\alpha$ -ラクトアルブミンは、 $2\mu\text{g}$ のトリプシンで100%タンパク質分解された。

### 実施例35

#### 卵白タンパク質の還元

乾燥したニワトリ卵白を Shigma Chemical Co.から購入した。卵白中全タンパク質の約80%がアレルゲンである。 $20\text{mg/ml}$ の卵白溶液をPBSに再懸濁し mBBR 蛍光標識及びSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動分析を用いる還元実験に可溶性卵白タンパク質を用いた。使用した処理は、対照(還元剤なし)、NTS、DTT+チオレドキシン、還元グルタチオン(GSH)及び還元グルタチオン/グルタチオンレダクターゼ/NADPHとした。反応を、PBS中で $20\text{mg/ml}$ の卵白懸濁液からの $23\mu\text{l}$ の可溶性タンパク質と最終容量 $100\mu\text{l}$ で行った。NTSにおいては、 $7.5\text{mM}$ NADPH、 $2.4\mu\text{g}$ のチオレドキシン及び $2.1\mu\text{g}$ のNTRを用いた。チオレドキシンをDTTで還元した場合、NADPH及びNTRを除き、DTTを $1.5\text{mM}$ まで加えた。使用したGSH濃度は $3\text{mM}$ であった。GSH/GR/NADPH系で還元するために、 $3\text{mM}$ GSH、 $4\mu\text{g}$ のGR及び $7.5\text{mM}$ NADPHを用いた。混合液を室温で1時間インキュベートした。インキュベーション後、 $7\mu\text{l}$ の $80\text{mM}$ mBBRを加え、反応を室温で15分間続けた。反応を停止し、 $10\mu\text{l}$ の $100\text{mM}$ メルカプトエタノール、 $10\mu\text{l}$ の20%SDS及び $10\mu\text{l}$ の50%グリセロールを加えることにより過剰量のmBBRを誘導した。次に、試料をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した。本実験の結果から、NTS及びDTT+チオレドキシンが約

80%アレルゲンの卵白タンパク質を還元するのに非常に有効であることがわかった。GSH又はGSH/GR/NADPHは、対照と同じレベルの還元を示したので卵白タンパク質の還元剤として無効である。

### 実施例 3 6

#### アレルギー発現性実験用動物の感作

本実験に用いられる動物は、高IgE生産スパニエルの同系集団からの種々のペアの同腹きょうだいの間に生まれたアトピーイヌとした。

兄弟で生ませた同系IgE応答動物の雌に同じ母体の9匹の仔イヌ（雄4匹、雌5匹）が生まれた。新生1日目に、牛乳、ダイズ及び米の実験のために9匹の仔イヌの同じ母体仔を2つのグループに分けた。5匹の仔イヌのグループIは0.2mlのミヨウバン中実施例33に記載された1 $\mu$ gの市販のダイズエキスを右腋に皮下（SQ）注射した。4匹の仔イヌのグループIIは0.2mlの食塩水及び0.2mlのミヨウバンに可溶化した1 $\mu$ gの市販の牛乳の粉乳エキス（実施例33に記載）を右腋にSQ注射した。また、9匹全員に0.2mlのミヨウバン中1 $\mu$ gの製品1:10 w/v米アレルゲンエキス（カタログNo.3549ED, Miles, Inc.インディアナ州エルクハルト）を左腋にSQ投与した。

3、7及び11週齢に、仔イヌ全員に0.5mlの弱毒化ジステンパー肝炎生ワクチン（Pitman-Moore, ペンシルバニア州ワシントンズクロッシング）を肩にSQでワクチン注射した。ワクチン注射の2日及び9日後に、新生仔期間に投与した同じ食物抗原を投与した。例えば、グループIの5匹のイヌに0.2mlのミヨウバン中1 $\mu$ gのダイズエキスを、グループIIの4匹のイヌに0.2mlミヨウバン中1 $\mu$ gの牛乳を、9匹の仔イヌ全員に0.2mlのミヨウバン中1 $\mu$ gの米エキスを各々右及び左腋にSQ投与した。

<sup>125</sup>I標識ウサギ抗イヌIgE血清（Frick, O.L.ら（1983）Am. J. Vet. Res. 44: 440-445）をRAST分析に用いた。標準RASTプロトコールのように（Wide, L.ら（1967）Lancet 2:1105-1107）、臭化シアン活性化ろ紙ディスクを100 $\mu$ gのダイズ、牛乳或いは米抗原と反応させた。非アトピーモンゲレル仔イヌからの新生イヌ請帯血清のプールを負の対照或いはベースライン cpmとして用いた。

仔イヌを6週間哺乳し、通常のパピーチャウ（Ralston-Purina社、ミズーリ州



セントルイス)に感作タンパク質、ダイズミール、乾燥ホエー及び米もみ殻を含んだものに離乳した。カリフォルニア大学、デビス、動物供給施設、獣医薬学部  
の動物治療及び管理のもとで餌を1回/日与え、水を任意に与えた。6ヵ月後、  
通常のフィールドアンドファームドッグチャウの餌を与えた。

3～4ヵ月齢で、仔イヌが特定の食物アレルギーに対するIgE抗体ができ  
ていることがわかったときに、同じ母体の9匹の仔イヌ全員に二重盲検の240ml  
のダイズ或いは牛乳乳児用、トーフ、かゆ又はバニラ香味ビボネックスタンパク  
質加水分解産物(Norwich-Eaton Co., コネチカット州ノリッジ)を早朝に与えた  
。抗原投与する前に及びその日の間中2時間おきに腹部の周りを臍の高さに測定  
した。痒疹又は皮疹の臨床上の徴候、嘔吐及び便秘の回数と特徴並びに咳又は呼  
吸困難及び鼻の排泄物について獣医が詳しく診察した。4日間反応のかかる徴候  
を監視した。次回の抗原投与の餌を7日後に与えた。

同じ母体の9匹の仔イヌは全員、体重が増え、診察の問題もなく正常に発達し  
た。感作された食物を抗原投与しない限り下痢又は他の胃腸の徴候がなかった。  
また、皮膚又は呼吸異常も起きなかった。ワクチン注射又は免疫感作に対する不  
都合な反応もなかった。

3種類の食物タンパク質に対するイヌIgE-RASTを、2週間おきに静脈  
血を採血して行った。

対応する牛乳(4ヵ月目に抗原投与した際 $p < 0.05$ )及びダイズ(最初の  
3ヵ月間 $p < 0.005$ )免疫感作したイヌが、対照より著しく多くのIgE抗  
食物抗体を産生した。IgE抗米抗体の平均力価は、5～10週目に上昇し、プ  
ラトーになり、20～30週齢後にまた鋭く上昇する。下痢や腹部の浮腫の統計  
的に有意な反応は、食事でダイズや牛乳を各々与えた場合にダイズ及び牛乳免疫  
感作したイヌに現れた。

別のグループの牛乳、ダイズ、小麦及び牛肉アレルギーの8匹イヌも上記の方  
法と同様の方法で展開させた。記載された高IgE生産スパニエルの同系集団の  
他の同じ母体からの4匹の同腹きょうだいに、実施例33に記載された各 $1\mu\text{g}$   
の製品牛乳、ダイズ、小麦及び牛肉アレルギーエキスを右腋にSQ注射した。同  
じ母体からの4匹の仔イヌを対照とした。8匹の仔イヌ全員に $0.2\text{ml}$ のミヨウ

バ

ン中  $1 \mu\text{g}$  の米エキスを左腋に S Q 投与した。上記のように仔イヌにワクチン注射し、各ワクチン注射の 2 日及び 9 日後に同じ食物抗原を新生仔として与えた同量で投与した。上記のように、適切な感作タンパク質（即ち、牛乳、ダイズ、牛肉及び小麦）を含有した食物を同じスケジュールで与えた。前のダイズ及び牛乳アレルギーイヌとのように、これらの免疫感作したイヌは対照より著しく多くの抗特異的食物 IgE 抗体（小麦及び牛肉抗体を含む）を生産した。また、下痢や腹部浮腫の統計的に有意な反応も、小麦、牛肉、ダイズ又は牛乳を含む食物を抗原投与した場合に免疫感作されたイヌに現れた。

### 実施例 3 7

#### 還元チオレドキシンで処理した食物アレルギーにおけるアレルギー発現性低下の皮膚テストの定量

実施例 3 3 に記載されたチオレドキシン処理食物アレルギー希釈液の  $100 \mu\text{l}$  の各希釈液の分割量を、実施例 3 6 に記載された適切に感作したイヌの腹部皮膚に皮内注射した（例えば、牛乳感作イヌに牛乳希釈液を注射した）。アレルギー希釈注射の前に、イヌの前脚の静脈に  $4 \text{ ml}$  の 0.5 % エバンスブルー色素を注射した。アレルギー反応を示すイヌは、アレルギー注射面に青色に着色した膨疹を生じた。発生した 10 分後に膨疹のサイズ（長さと幅）を測定した。膨疹の測定サイズ及び各アレルギー標品の濃度範囲の注射後の希釈終点をアレルギー発現性指標として用いた。チオレドキシン処理は、 $1 \times 10^5$  希釈度のダイズで 50 % 防御、 $3 \times 10^4$  希釈度の牛乳で完全な防御、 $1 \times 10^6$  希釈度の小麦で完全な防御及び  $1 \times 10^5$  希釈度の牛肉で少なくとも部分的防御を示すことがわかった（各々図 1、図 2、図 3、図 4 及び図 5 参照）。

### 実施例 3 8

#### 還元チオレドキシンで処理した食物アレルギーのアレルギー発現性の摂食試験の定量

摂食の約 1 週間前に実施例 3 6 に記載された方法で感作したイヌを、前の実施例に記載された市販のアレルギーエキスをを用いる適切な食物アレルギーで実施例

36のように皮内に皮膚テストした。これらの結果に基づいて、イヌを“対照”及び“チオレドキシン処理”グループに分けた。各グループを相補的感受性を有

する代表でまとめた。即ち、等しい数の強い、中位及び弱い反応をするものを各グループに選んだ。特にことわらない限り、グループは3匹のイヌから構成された(1実験あたり6匹のイヌ)。摂食抗原投与前の3日間及び投与後の5日間、イヌをヒル処方ダイエットイヌd/d食(Hill's Division of Colgate Palmolive Co., カンサス州トペカ)で飼った。この間中、吐き気及び嘔吐のような臨床上の徴候についてイヌを診察した。更に、便通を監視し、試験されている食物に対するアレルギー応答の指標として評価した。イヌの便通をアレルギー食の抗原投与の前後3日間数え、そのかたさを数字で示した: 1=堅い、2=軟らかい及び3=軟らかすぎる。次に、便通の回数にかたさの係数をかけて便通の評点を計算した。試験されている食物アレルギーに対するアレルギー応答の指標として、各グループ(“対照”又は“チオレドキシン処理”)の1日あたりの正味の平均便通最終評点を、アレルギー食抗原投与前の1日平均便通評点を投与後から引くことにより計算した。1日あたりの正味の平均便通評点が高いほど強いアレルギー応答を表す。

食事を調製及び投与するために用いられる手順を下記に示す。特にことわらない限り、室温で反応を行った。

#### ダイズ

市販のダイズ製品(鉄を補充したイソミル, Ross Laboratories, オハイオ州コロンブス)、1.026 kgを3リットルの水に溶解した。その溶液を1.925リットルの2つのロットに分け、1つを対照として用い、もう1つを次の通りNADP/チオレドキシン系(NTS)で処理した。45 mM NADPH、564  $\mu$ gのNADP-チオレドキシンレダクターゼ(NTR)及び1.125 mgのチオレドキシンを含む混合液(全て30 mM トリス-HCl バッファー、pH 7.9に溶解した)を5分間ブレインキュベートし、次に、1.925リットル製品ロットの1つに加えた(以後“チオレドキシン処理”ロット)。チオレドキシン系を加えた後、一定に攪拌しながら更に1時間インキュベーションを続けた。同量のバ

ッファーを対照ロットに加えた。インキュベーション後、600 mlの製品を割り当てたグループの3匹のイヌの各々に与えた。イヌに与えた一匹分は、インキュベーション前の25.0 gのダイズタンパク質と等価とした。

### 小麦

無漂白小麦粉、1.5 kgを、37℃に加熱しておいた3リットルの水にガロンサイズのワーリングブレンダーで加えた。1分混合した後、小麦粉懸濁液を2つのロットに等しく分け、1つを対照として用い、もう1つを次の通りNADP/チオレドキシン系で処理した。45 mM NADPH、564  $\mu$ gの(NTR)及び1.125 mgのチオレドキシンを全て30 mM トリス-HCl バッファー、pH 7.9に溶解したものを含む混合液を5分間ブレインキュベートし、次に、1つのロットに加えた(以後、“チオレドキシン処理”ロット)。等価量のバッファーを対照ロットに加えた。双方の標品をとときき攪拌しながら37℃で1時間インキュベートした。600 mlの容量を各標品から取り出し、1つのカン(15~3/4 oz) d/dのコムギを含まない米/小羊ベースのドッグフードと混合し、割り当てたロットの3匹のイヌに与えた。また、これらの一匹分は、25 gの小麦タンパク質と等価とした。8匹のイヌを用いた実験では、小麦粉を2.0 kgに増やし、手順をそれに応じて拡大した。

### 牛乳

同様に、乾燥した CARNATIONを水で再構成した標品をNADP/チオレドキシン系とインキュベートした。前のように、3匹のイヌに未処理乳を投与し、3匹のイヌに処理乳を投与した。イヌが投与された最終部分は、10 gの乳タンパク質と等価とした。

### 結果

用いられたNADP/チオレドキシン系の成分のレベルは、上記実施例15に記載されたドゥ実験より著しく高いレベルであった。この摂食実験では、予備的試験から、高レベルのこれらの化合物が試験管内でmBB r /SDS ポリアクリルアミドゲル法によって求めたアレルゲンタンパク質を還元するのに必要であることが示された。摂食試験においてタンパク質1 gに対して各イヌに用いられる

NADP／チオレドキシン系の各成分の量は、焼き試験に用いられた量に相対して下記に示される。

	小麦粉、牛乳、 ダイズ製品*
チオレドキシン	5-X
NTR	5-X
NADPH	2-X

\*表示した量は、3  $\mu$ g のチオレドキシン、1.5  $\mu$ g のNTR及び0.3  $\mu$ M NADPHを小麦タンパク質1 gに対して加えた上記焼き試験に用いられたものに相対する。焼き試験では、約200 gの小麦粉又は約20 gの小麦タンパク質を用いてローフを焼いた。摂食実験については、食物標品をNADP／チオレドキシン系の成分と室温（牛乳及びダイズ）或いは37℃（小麦）で1時間インキュベートした。

“臨床上の徴候”（嘔吐及び吐き気）及び“便通評点”（図6）に基づいて、チオレドキシン処理は、ダイズ及び小麦製品に対するイヌのアレルゲン応答を低下させることがわかった。乳製品のアレルギー発現性は、NTSでの処理によっても低下させることができる。用いられるチオレドキシンとNTRは大腸菌由来であるが、酵母のような他の供給源由来のチオレドキシン及びチオレドキシンh及びmを用いることもできることは留意されるべきである。

#### おわりに

前述の本発明の一般的説明及びその適用を示す個々の実施例から、本発明が多くの到達する結果があることがわかる。本発明は、基本的には新規なドウ及びドウ混合物並びに新規なドウをつくりかつドウ及び焼き製品の品質を改良する新規な方法並びに穀物製品における酵素インヒビターを不活性化する方法を提供するものである。本発明は、また、動物毒素の生物活性及び不活性を変えかつ数種の食物、即ち、小麦、卵、牛乳、ダイズ及び牛肉のアレルギー発現性を消退又は低下させる新規な方法を提供するものである。本発明は、更に、プルラナーゼインヒビターである新規なタンパク質及びその不活性化方法を提供するもので

ある。

本発明は、ある特定の実施態様に関して記載したが、当業者に明らかになる本発明が関係する種々の変更も下記の請求の範囲で定義される本発明の範囲内に入  
ることは理解されなければならない。

【図1】

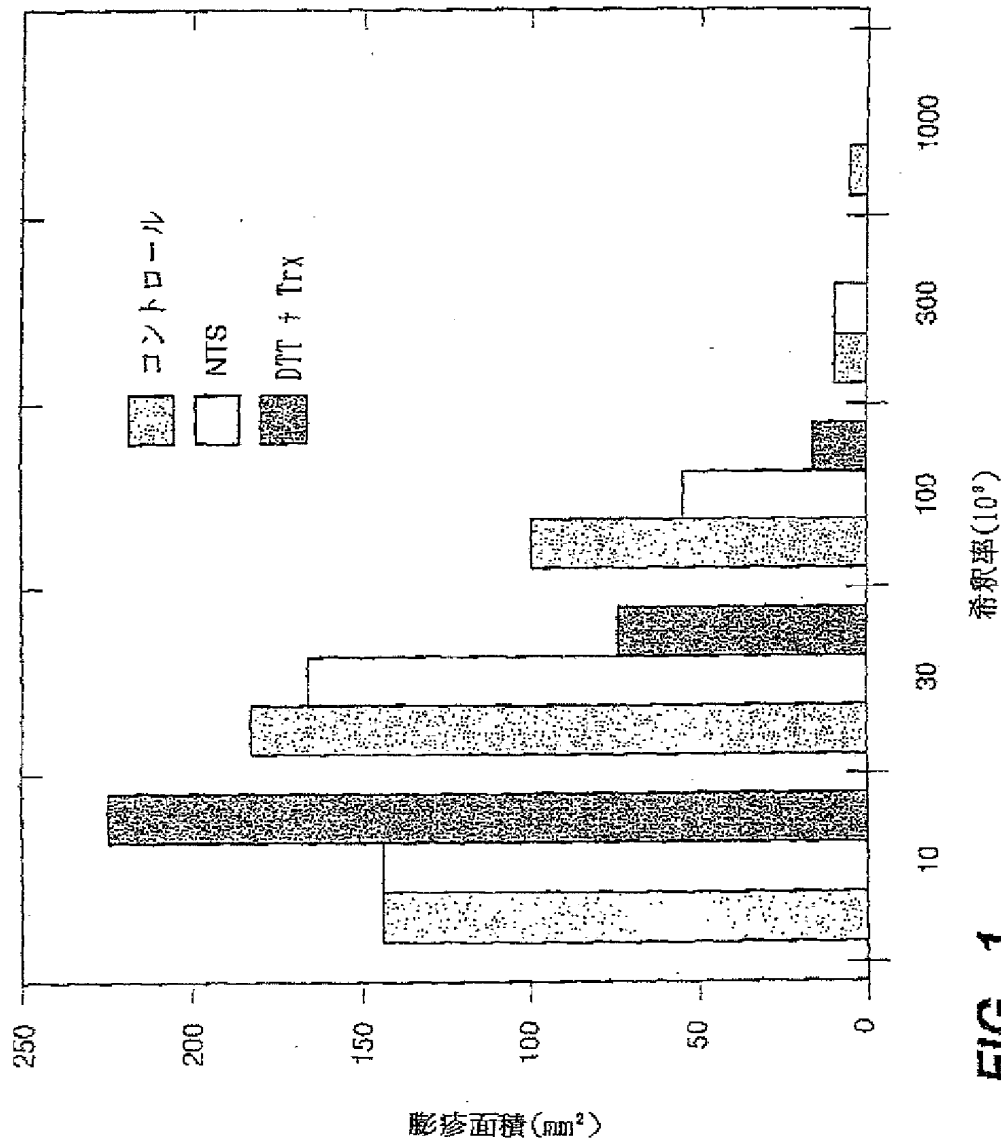


FIG. 1

【図2】

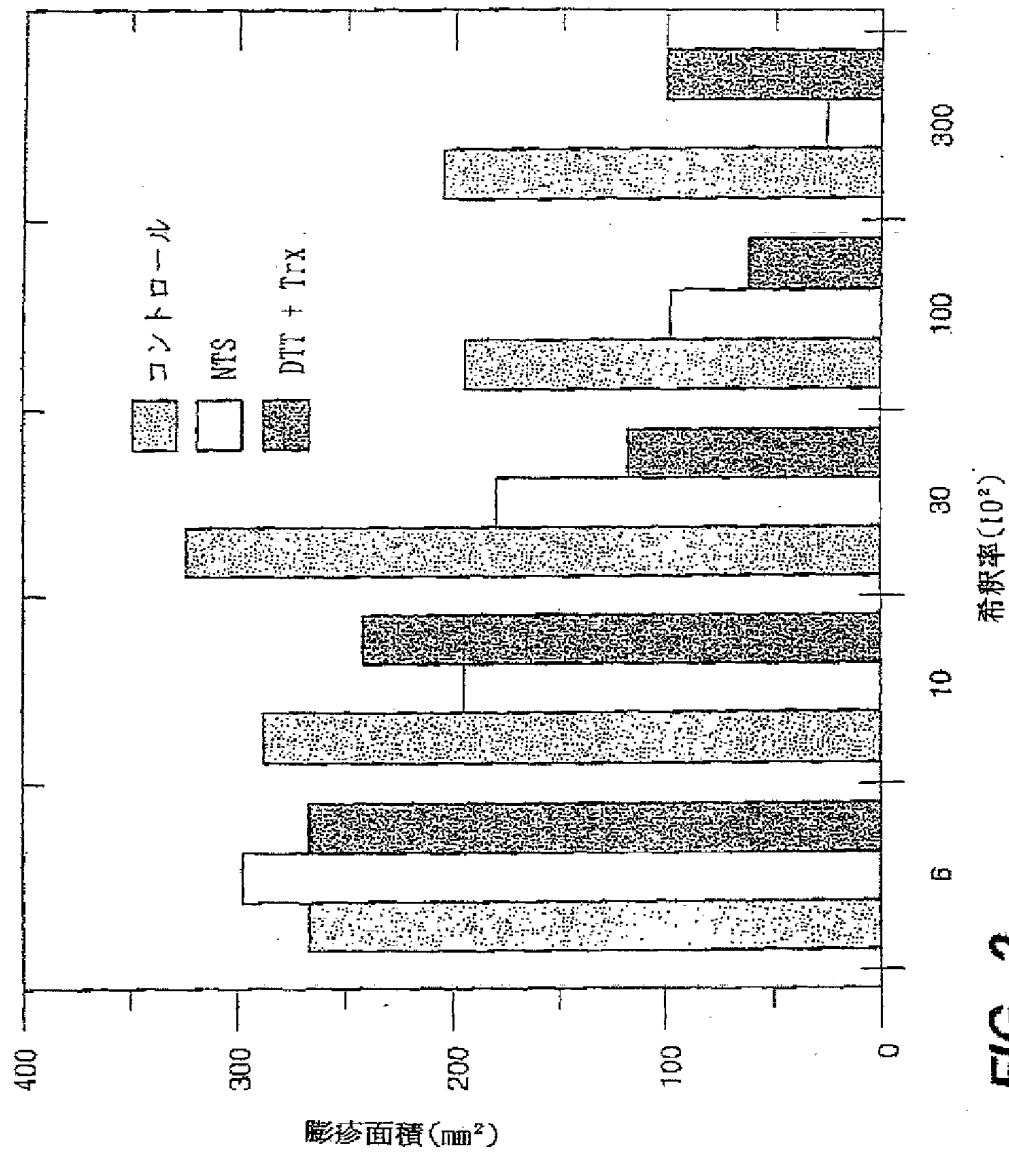


FIG. 2

【図3】

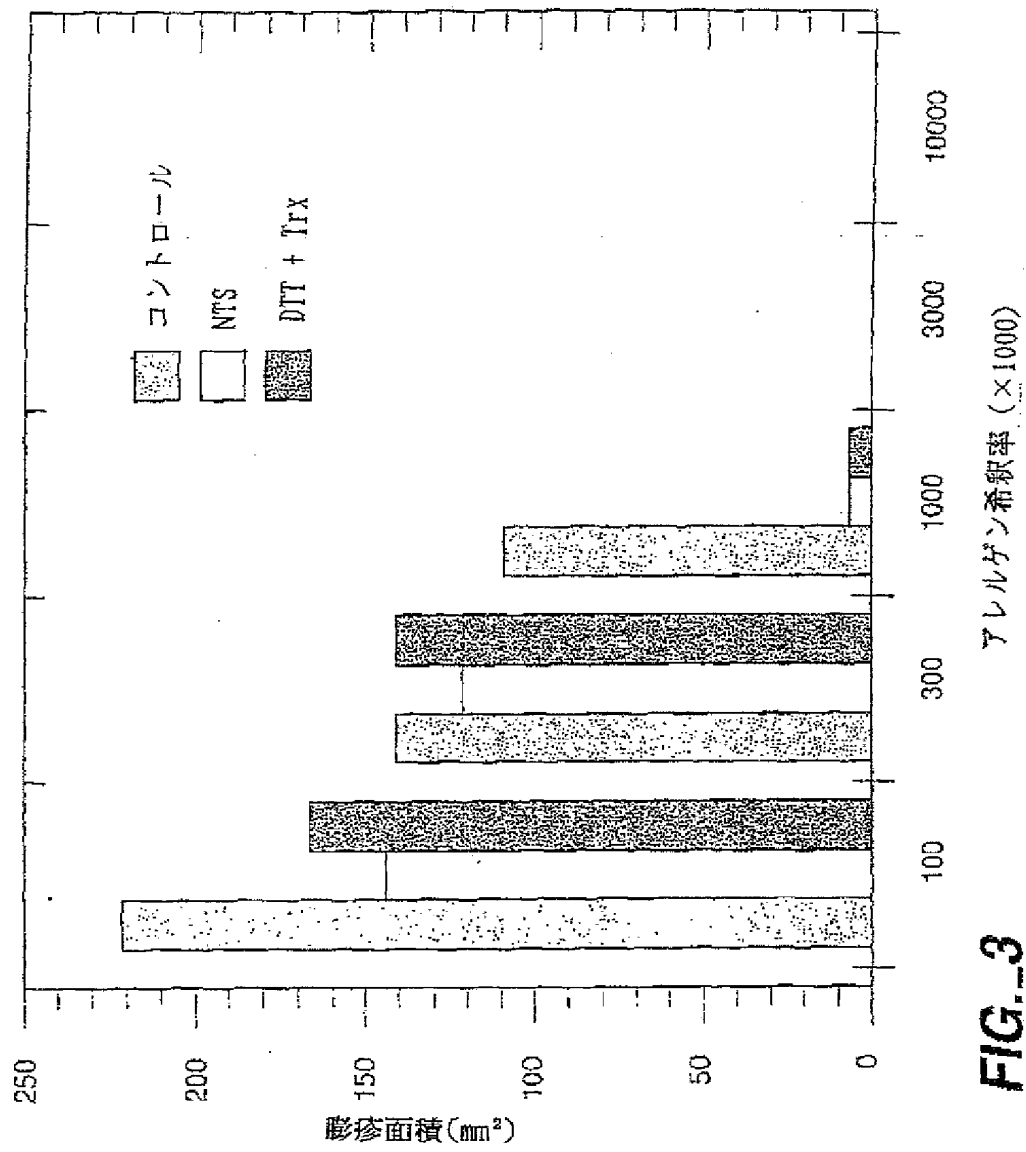


FIG. 3



【図4】

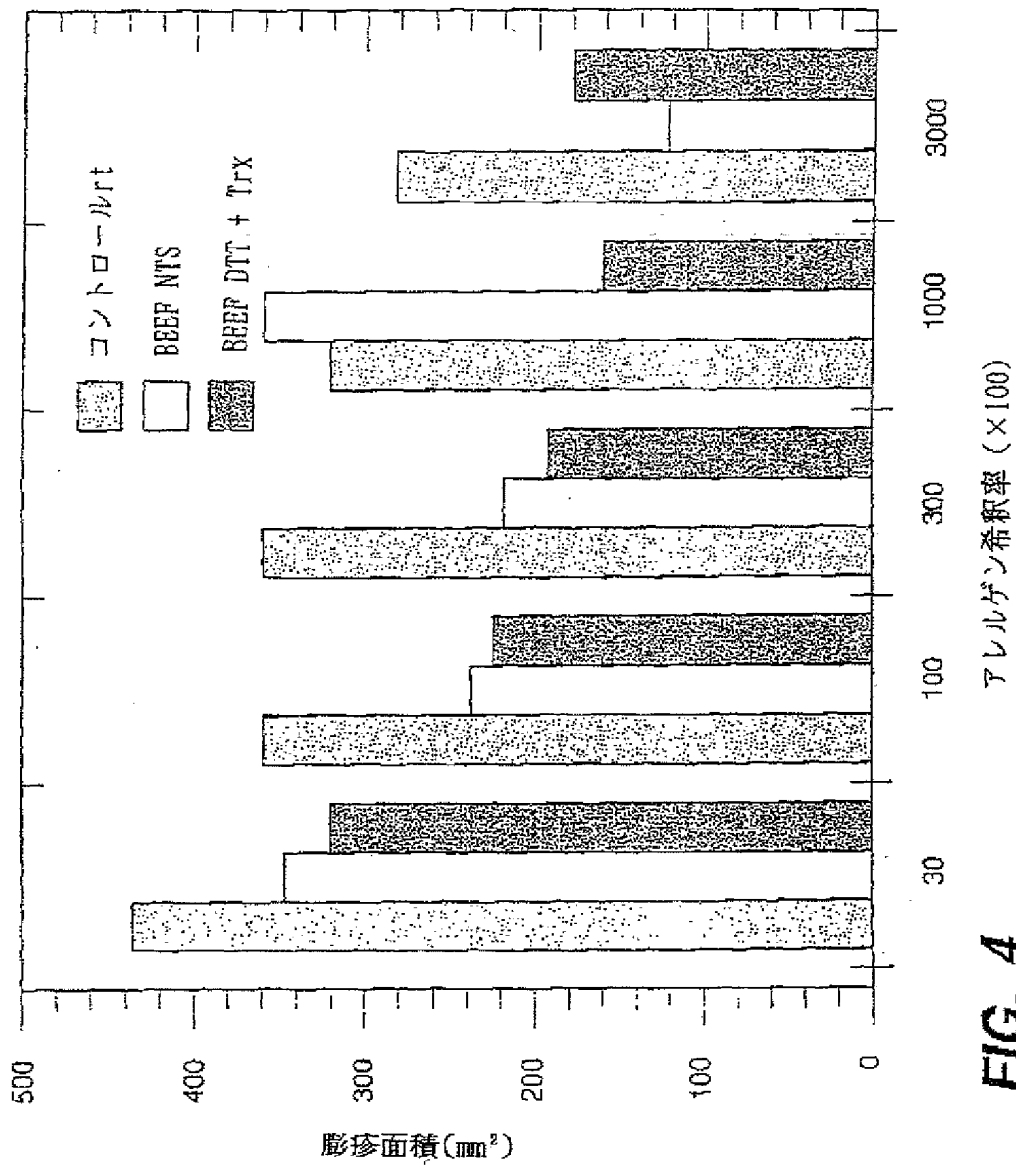


FIG. 4

【図5】

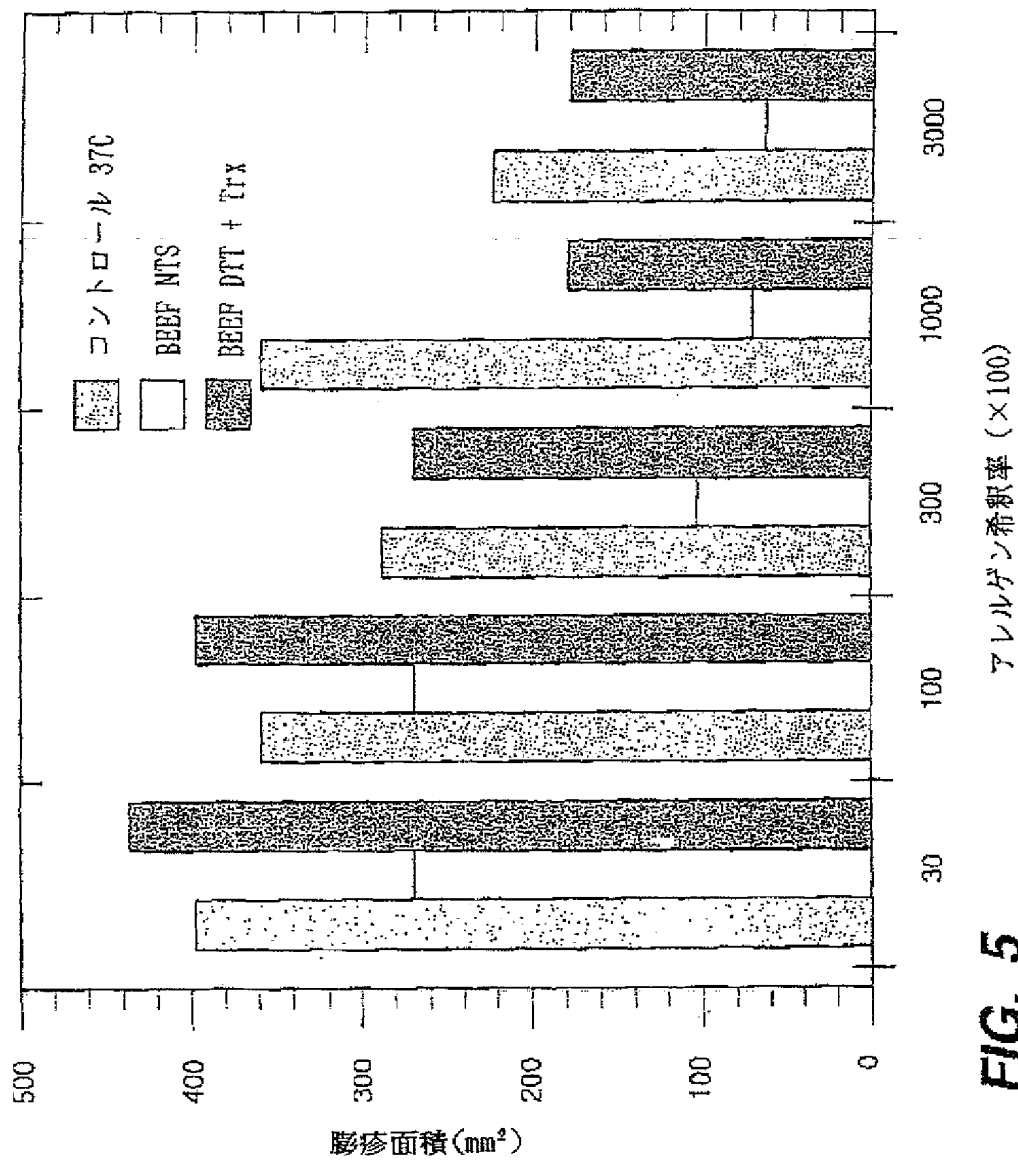


FIG. 5

【図 6】

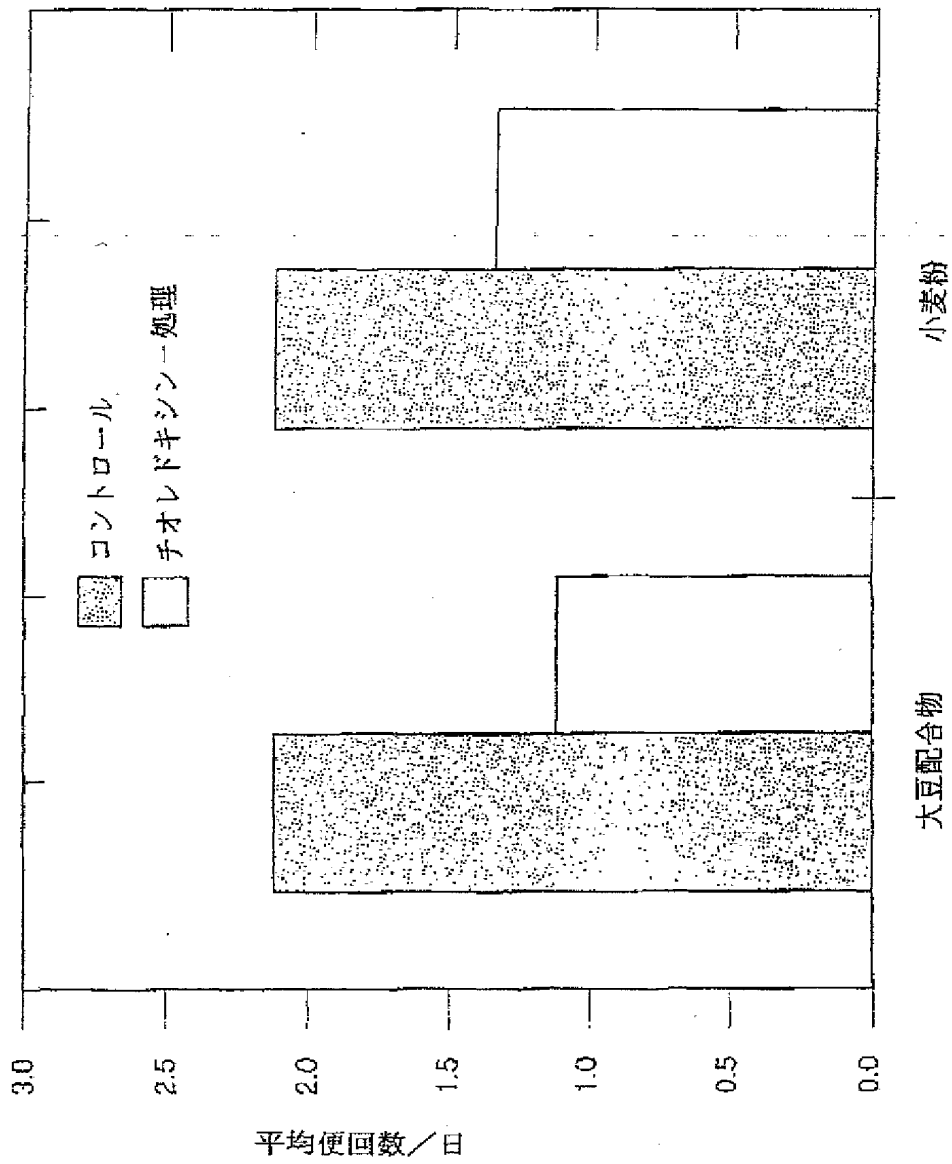


FIG. 6

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US95/13206

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) : Please See Extra Sheet.

US CL : Please See Extra Sheet.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 426/549, 557, 618; 435/18, 69.1, 177, 188, 202, 210, 255; 530/350, 374, 387.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
NONE

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

APS, BIOSIS, CA

search terms: food#, foodstuff#, thioredoxin, allerg?, reduct?, oxid?

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US, A, 5,028,419 (PIGIET) 02 July 1991, see entire document.	1-16
Y	PLANT PHYSIOLOGY, Volume 85, issued 1987, Johnson et al., "Reduction of Purothionin by the Wheat Seed Thioredoxin System", pages 446-451, see entire document.	1-16
Y	ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, Volume 266, Number 2, issued 01 November 1988, Florencio et al., "An NADP/Thioredoxin System in Leaves: Purification and Characterization of NADP-Thioredoxin Reductase and Thioredoxin <i>b</i> from Spinach", pages 496-507, see entire document.	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"	later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Z"	document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search

01 FEBRUARY 1996

Date of mailing of the international search report

08 FEB 1996

Name and mailing address of the ISA/US  
Commissioner of Patents and Trademarks  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231

Authorized officer

HYOSUK KIM

Facsimile No. (703) 305-3230

Telephone No. (703) 308-0151

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)\*

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.  
 PCT/US95/13206

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MOLECULAR IMMUNOLOGY, Volume 29, Number 10, issued October 1992, Kahlert et al., "Epitope Analysis of the Allergen Ovalbumin (Gal d II) with Monoclonal Antibodies and Patients' IgE", pages 1193-1201, see entire document.	1-16
Y	AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL CHEMISTRY, Volume 49, Number 7, issued July 1985, Matsuda et al., "Reduction of Ovomuroid Immunogenic Activity on Peptic Fragmentation and Heat Denaturation", pages 2237-2241, see entire document.	1-16
A	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Volume 264, Number 24, issued 25 August 1989, Holmgren, "Thioredoxin and Glutaredoxin Systems", pages 13963-13966, see entire document.	1-16
Y	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Volume 266, Number 24, issued 25 August 1991, Kobrehel et al., "Role of the NADP/Thioredoxin System in the Reduction of alpha-Amylase and Trypsin Inhibitor Proteins," pages 16135-16140, see entire document.	1-16

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US95/13206

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:  
IPC (6):

C12N 9/28, 9/96, 11/02; C12Q 1/34; A21D 13/00; A23L 1/18, 1/168, 1/172; A61K 35/70, 35/14, 35/80; C07K 1/00, 2/00, 4/00, 14/00, 16/00

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:  
US CL :

426/549, 557, 618; 435/18, 69.1, 177, 188, 302, 210, 255; 530/350, 374, 387.1

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>9</sup>	識別記号	F I	
// A 2 3 K 1/16	3 0 4	A 2 3 K 1/16	3 0 4 C
1/18		1/18	A
A 6 1 K 35/20		A 6 1 K 35/20	
35/34	ABF	35/34	ABF
35/54		35/54	
35/78		35/78	U
38/46		37/54	

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, MW, SD, SZ, UG), AL, AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, C A, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, F I, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, M G, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, UZ, VN

(72)発明者 コブレール カロリー

フランス エフ-34060 モンベリエ セ  
デックス 01 ブラス ヴィアーラ 2  
ラボラトワール ド テクノロジー ド  
セラール イエヌエールア

(72)発明者 イー ボイホン シー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州  
94598 ウォルナット クリーク プリム  
ローズ レーン 3215

(72)発明者 ロサーノ ローザ

スペイン エ-28006 マドリッド ヴェ  
ラスケス 144 コンセホ スペリオール  
デ インヴェスティガシオネス シエン  
ティフィカス セントロ デ インヴェス  
ティガシオネス バイオロジカス

(72)発明者 フリック オスカー エル

アメリカ合衆国 カリフォルニア州  
94117 サン フランシスコ バーナッサ  
ス アベニュー 370

(72)発明者 アーメル リチャード ダブリュー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州  
95694 ウィンターズ オーチャード レ  
ーン 108